

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040888

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.11

(21) Номер заявки
201990393

(22) Дата подачи заявки
2017.07.31

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ MASP-3, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ЦЕЛЯХ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАССТРОЙСТВ

(31) 62/369,674; 62/419,420; 62/478,336

(32) 2016.08.01; 2016.11.08; 2017.03.29

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/044714

(87) WO 2018/026722 2018.02.08

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

(56) US-A1-20130344073
US-A1-20030186419
US-A1-20120282263
US-A1-20040031072
WO-A1-2015116753
US-A1-20120177664
US-A1-20130005949
US-A1-20160031976
US-B2-9394368
US-A1-20120266264

(72) Изобретатель:
Каммингс У. Джейсон, Демопулос
Грегори А., Дадлер Томас (US),
Швебле Ханс-Вильгельм (GB),
Хьелкер Ларри У., Вуд Кристи Л.,
Ябуки Мунехиса (US)

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

(57) Изобретение относится к MASP-3-ингибирующим антителам и композициям, содержащим указанные антитела, для их применения в целях ингибирования побочных эффектов MASP-3-зависимой активации комплемента.

040888 B1

040888 B1

040888

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается преимущество предварительной заявки на патент США № 62/369674, поданной 1 августа 2016, а также преимущество предварительной заявки на патент США № 62/419420, поданной 8 ноября, 2016, и преимущество предварительной заявки на патент США № 62/478336, поданной 29 марта, 2017, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Указание относительно списка последовательностей

Список последовательностей, прилагаемый к настоящей заявке, представлен не в бумажной копии, а в виде текстового файла, а поэтому он вводится в настоящее описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, представлен под именем "MP_1_0254_US_Sequence_Listing_20170628_ST25"; этот файл, имеющий размер 191 кБ, был создан 28 июня 2017 и подан через EFS-Web вместе с подачей настоящей заявки.

Предшествующий уровень техники

Система комплемента действует на ранней стадии как механизм инициации, амплификации и расщепления иммунного ответа на микробную инфекцию и на другие острые инфекции (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York) у человека и других позвоночных. Хотя активация комплемента обеспечивает эффективную защиту первого ряда от потенциальных патогенов, однако, активация комплемента, которая стимулирует вырабатывание протективного иммунного ответа, может также представлять потенциальную угрозу для хозяина (K.R. Kalli et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 75:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Invest.* 24:219-228, 1994). Так, например, продукты протеолиза C3 и C5 стимулируют рекрутинг и активацию нейтрофилов. Хотя нейтрофилы необходимы для защиты хозяина, однако, активированные нейтрофилы не могут быть идентифицированы по высвобождению ими деструктивных ферментов и могут вызывать поражение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать отложение литических компонентов комплемента на участках, расположенных поблизости от клеток-хозяев, а также на микробных мишенях, что приводит к лизису клеток-хозяев.

Система комплемента также участвует в патогенезе различных острых и хронических патологических состояний, включая инфаркт миокарда, инсульт, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), реперфузионное поражение, септический шок, проницаемость капилляров после тепловых ожогов, воспаление после операции по кардиопульмонарному шунтированию, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, тяжелая миастения и болезнь Альцгеймера. Почти при всех этих состояниях сам комплемент не вызывает эти состояния, но является одним из нескольких факторов, участвующих в их патогенезе. Тем не менее, активация комплемента может представлять собой основной патологический механизм и служить эффективной точкой клинического контроля при многих из указанных патологических состояниях. Все возрастающее признание важного значения в понимании механизмов комплемент-опосредованного поражения тканей при различных патологических состояниях еще раз указывает на необходимость разработки эффективных комплемент-ингибирующих лекарственных средств. В настоящее время экулизумаб (Soliris®), т.е. антитело против C5, является единственным лекарственным средством, мишенью которого является комплемент и которое было разрешено для применения в медицине. Кроме того, C5 является одним из нескольких эффекторных молекул, действующих на поздних стадиях реакции системы комплемента, и блокада C5 не приводит к ингибированию активации системы комплемента. Поэтому ингибитор стадий инициации активации комплемента имел бы существенное преимущество по сравнению с ингибитором одного компонента, действующего на "поздних стадиях" в каскаде реакций системы комплемента.

В настоящее время хорошо известно, что система комплемента может активироваться тремя различными путями: по классическому пути, по лектиновому пути и по альтернативному пути. Классический путь обычно запускается комплексом, состоящим из антител хозяина, связанных с чужеродной частицей (т.е. с антигеном), и для вырабатывания специфического гуморального ответа требуется предварительная стимуляция антигеном. Поскольку активация классического пути зависит от предварительного адаптивного иммунного ответа у хозяина, то такой классический путь является частью приобретенной иммунной системы. В противоположность этому, лектиновый и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунного ответа и являются частью природной иммунной системы.

Активация системы комплемента приводит к последующей активации серин-протеазных зимогенов. Первой стадией активации классического пути является связывание молекулы специфического распознавания, C1q, с антиген-связанными молекулами IgG и IgM. C1q ассоциируется с серин-протеазными проферментами C1r и C1s в виде комплекса, обозначаемого C1. После связывания C1q с иммунными комплексами, аутопротеолитическое расщепление Arg-Ile-сайта C1r сопровождается C1r-опосредуемым расщеплением и активацией C1s, что сообщает ему способность расщеплять C4 и C2. C4 расщепляется на два фрагмента, обозначаемых C4a и C4b, и, аналогичным образом, C2 расщепляется на компоненты C2a и C2b. Фрагменты C4b могут образовывать ковалентные связи с расположенными рядом гидроксильными группами или аминокислотными группами и продуцировать C3-конвертазу (C4b2a) посредством нековалентного взаимодействия с фрагментом C2a активированного C2. C3-конвертаза (C4b2a) активирует C3

путем протеолитического расщепления на субкомпоненты C3a и C3b, что приводит к продуцированию C5-конвертазы (C4b2a3b), которая посредством расщепления C5 способствует образованию комплекса, атакующего мембрану (C5b вместе с C6, C7, C8 и C9 также обозначаются "MAC"), и этот комплекс может разрушать клеточные мембраны и вызывать клеточный лизис. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) ковалентно осаждаются на поверхностях чужеродных мишеней, которые распознаются рецепторами комплемента на множестве фагоцитов.

Независимо от этого первой стадией активации системы комплемента по лектиновому пути также является связывание молекул специфического распознавания, после которого происходит активация связанных серин-протеазных проферментов. Однако в отличие от C1q, связывающегося с иммунным комплексом, молекулы распознавания в лектиновом пути составляют группу углевод-связывающих белков (маннан-связывающий лектин (MBL), Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и лектин С-типа CL-11), имеющие общее название "лектины". См. J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 7572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)). См. 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 S. et al., *J. Immunol.* 185 (10):6096-6104 (2010).

Ikeda и сотрудниками было впервые продемонстрировано, что MBL, подобно C1q, может активировать систему комплемента после связывания с эритроцитами, покрытыми дрожжевым маннаном, по C4-зависимому механизму (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454 (1987)). MBL, член семейства белков коллектинов представляет собой кальций-зависимый лектин, который связывается с углеводами по 3- и 4-гидроксигруппам, ориентированным в экваториальной плоскости пиранозного кольца. Таким образом, наиболее часто встречающимися лигандами для MBL являются D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, а углеводы, не удовлетворяющие стерическим требованиям, имеют недетектируемую аффинность по отношению к MBL (Weis W.I. et al., *Nature* 360:127-134 (1992)). Взаимодействие между MBL и одновалентными сахарами является очень слабым, а их константы диссоциации обычно находятся в одноразрядном миллимолярном интервале. MBL достигает тесного специфического связывания с гликановыми лигандами посредством avidности, т.е. посредством одновременного взаимодействия с множеством моносакхаридных остатков, расположенных в непосредственной близости друг от друга (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.*

299:129-136 (1992)). MBL распознает углеводные паттерны, которые обычно окаймляют микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи, паразиты и некоторые вирусы. В отличие от этого, MBL не распознает D-галактозу и сиаловую кислоту, предпоследние и последние сахара, которые обычно окаймляют "зрелый" комплекс гликоконъюгатов, присутствующих на гликопротеинах плазмы и клеточной поверхности у млекопитающих. Считается, что такая специфичность связывания стимулирует распознавание "чужеродных" поверхностей и способствует защите от "аутоактивации". Однако MBL не связывается с высокой аффинностью с кластерами гликанов-"предшественников" с высоким содержанием маннозы на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, секвестрированных в эндоплазматической ретикулеуме и в аппарате Гольджи клеток млекопитающих (Maynard et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794 (1982)). Кроме того, было показано, что MBL может связываться с полинуклеотидами ДНК и РНК, которые могут находиться на некротических и апоптотических клетках (Palaniyar et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1010:467-470 (2003); Nakamura et al., *J. Leuk. Biol.* 86:737-748 (2009)). Поэтому поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для активации по лектиновому пути посредством связывания с MBL.

Фиколины имеют лектиновый домен, отличающийся от лектинового домена MBL и называемый фибриноген-подобным доменом. Фиколины связываются с сахарными остатками по Ca^{++} -независимому механизму. У человека были идентифицированы фиколины трех видов (L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин). Два сывороточных фиколина, L-фиколин и Н-фиколин, имеют общую специфичность к N-ацетил-D-глюкозамину, однако, Н-фиколин также связывается и с N-ацетил-D-галактозамином. Различия в специфичности L-фиколина, Н-фиколина, CL-11 и MBL к сахарам означают, что различные лектины могут быть комплементарны различным гликоконъюгатам и нацелены на различные, хотя и перекрывающиеся, гликоконъюгаты. Эта концепция подтверждается последними сообщениями в литературе, указывающими на то, что из всех известных лектинов, участвующих в лектиновом пути, только L-фиколин специфически связывается с липотейхоевой кислотой, т.е. гликоконъюгатом клеточной стенки, присутствующим на всех грамположительных бактериях (Lynch et al., *J. Immunol.* 772: 1198-1202 (2004)). Кроме того, фиколины, помимо ацетилированных сахарных молекул, могут также связываться с ацетилированными аминокислотами и полипептидами (Thomsen et al., *Mol. Immunol.* 48(4):369-81 (2011)). Коллектины (т.е. MBL) и фиколины не обнаруживают какого-либо значимого сходства по своим аминокислотным последовательностям. Однако эти две группы белков имеют одинаковую организацию доменов и, подобно C1q, участвуют в сборке олигомерных структур, что максимизирует вероятность их связывания во многих сайтах.

Концентрации MBL в сыворотке у здоровых индивидуумов в высокой степени варьируются и генетически регулируются полиморфизмом/мутациями в промоторных и в кодирующих областях гена MBL. Уровень экспрессии MBL, как белка острой фазы, еще больше повышается в процессе воспаления. L-фиколин присутствует в сыворотке в концентрациях, аналогичных концентрациям MBL. Поэтому L-

фиколиновая ветвь лектинового пути по своей структуре является, возможно, сравнимой с MBL-ветвью. MBL и фиколины могут также действовать как опсоины, что позволяет фагоцитам нацеливаться на MBL- и фиколин-окаймляющие поверхности (см. 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)). Такая опсонизация требует взаимодействия этих белков с рецепторами фагоцитов (Kuhlman et al., *J. Exp. Med.* 169: 1733 (1989), Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 277:2448-54 (1996)), идентичность которых пока еще не установлена.

Человеческий MBL стимулирует специфическое и высокоаффинное взаимодействие посредством его коллаген-подобного домена с уникальными C1r/C1s-подобными сериновыми протеазами, называемыми MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP). В настоящее время описано три MASP. Сначала был идентифицирован один фермент "MASP", и этот фермент был охарактеризован как фермент, ответственный за инициацию каскада реакций комплемента (т.е. реакций расщепления C2 и C4) (Matsushita et al., *J. Exp. Med.* 176(6):1497-1502 (1992), Ji et al., *J. Immunol.* 150:571-578 (1993)). Затем было определено, что MASP-активность фактически представляет собой смесь двух протеаз: MASP-1 и MASP-2 (Thiel et al., *Nature* 381:520-523 (1998)). Однако было продемонстрировано, что для активации комплемента достаточно и одного комплекса MBL-MASP-2 (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100 (2000)). Кроме того, только MASP-2 в высокой степени расщепляет C2 и C4 (Ambrus et al., *J. Immunol.* 160:1374-1382, (2003)). Следовательно, MASP-2 представляет собой протеазу, ответственную за активацию C4 и C2 и генерирование C3-конвертазы, C4b2a. Этот механизм значительно отличается от механизма 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 организациям доменов C1r и C1s, т.е. ферментных компонентов комплекса C1 (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, (2000)). Эти домены включают N-концевой домен C1r/C1s/домен VEGF морского ежа/домен белка морфогенеза кости (CUB); домен, подобный эпидермальному фактору роста; второй домен CUB; tandem доменов белка регуляции комплемента и домен сериновой протеазы. Как и в протеазах C1, активация MASP-2 осуществляется посредством расщепления Arg-Пеп-связи непосредственно у домена сериновой протеазы, что приводит к расщеплению фермента на цепи A и B, связанные дисульфидными связями, где указанные цепи состоят из доменов сериновой протеазы.

MBL может также ассоциироваться с альтернативно сплайсированной формой MASP-2, известной как MBL-ассоциированный белок размером 19 кДа (MAp19) или небольшой MBL-ассоциированный белок (sMAP), который не обладает каталитической активностью MASP-2 (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 неизвестна (Degen et al., *J. Immunol. Methods*, 2011). Гены MASP-1 и MASP-2 расположены на человеческих хромосомах 3 и 1 соответственно (Schwaible et al., *Immunobiology* 205:455-466, (2002)).

Существует ряд данных, позволяющих предположить, что различные комплексы MBL-MASP и большая фракция MASP в сыворотке не образуют комплексы с MBL (Thiel et al., *J. Immunol.* 165:818-887, (2000)). Н- и L-фиколин связываются со всеми MASP и, как и MBL, активируют лектиновый путь комплемента (Dahl et al., *Immunity* 15:127-35, (2001); Matsushita et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, (2002)). Лектиновый и классические пути образуют общую C3-конвертазу (C4b2a), и на этой стадии, эти два пути сходятся.

Существует широко распространенное мнение, что лектиновый путь играет важную роль в защите неинфицированного хозяина от инфекции. Убедительные доказательства участия MBL в защите хозяина были получены в анализах, проводимых у пациентов со сниженными уровнями функционального MBL в сыворотке (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, (2002)). У этих пациентов наблюдается восприимчивость к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Такие симптомы обычно появляются в раннем возрасте в четком временном "окне" восприимчивости к инфекциям по мере убывания титров материнских антител, но еще до развития гуморального ответа с образованием полного репертуара антител. Этот синдром часто является следствием мутаций в нескольких сайтах коллагенозной части MBL, которые препятствуют соответствующему образованию олигомеров MBL. Однако, поскольку MBL может функционировать как опсонин независимо от комплемента, то неизвестно, в какой степени повышение чувствительности к инфекции обусловлено снижением активации комплемента.

В отличие от классических и лектиновых путей не было обнаружено каких-либо инициаторов альтернативного пути, которые обеспечивали бы функции распознавания, присущие C1q и лектинам в двух других путях. В настоящее время хорошо известно, что альтернативный путь спонтанно подвергается циклической активации на низком уровне, которая может легко усиливаться на чужеродных или других анамальных поверхностях (бактерий, дрожжей, инфицированных вирусом клеток или поврежденной ткани), не имеющих собственных молекулярных элементов, которые поддерживают уже имеющуюся спонтанную активацию комплемента. Существует четыре белка плазмы, непосредственно участвующих

в активации альтернативного пути, а именно, C3, факторы В и D, и пропердин.

Несмотря на наличие множества данных, указывающих на участие классических и альтернативных путей комплемента в патогенезе неинфекционных заболеваний у человека, роль лектинового пути в таком патогенезе еще только начали исследовать. Последние исследования показали, что активация лектинового пути может быть ответственна за активацию комплемента, и ассоциированное с ним воспаление при ишемии/реперфузионном повреждении. Collard и сотрудники (2000) сообщали, что культивированные эндотелиальные клетки, подвергаемые окислительному стрессу, связываются с MBL и обнаруживают осаждение C3 после воздействия на них человеческой сыворотки (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, (2000)). Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими моноклональными анти-MBL антителами приводит к ингибированию связывания с MBL и активации комплемента. Эти данные распространяются на крысиную модель ишемии миокарда-реперфузии, при которой у крыс, обработанных блокирующим антителом против крысиного MBL, наблюдалось более явное снижение повреждения миокарда после закупорки коронарной артерии, чем у крыс, обработанных контрольным антителом (Jordan et al., *Circulation* 104:1413-1418, (2001)). Молекулярный механизм связывания MBL с васкулярным эндотелием после окислительного стресса остается пока неясным, однако, последние исследования позволяют предположить, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием MBL с васкулярными эндотелиальными цитокератинами, а не с гликоконъюгатами (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, (2001)). Другие исследования указывали на роль классических и альтернативных путей в патогенезе ишемии/реперфузионном повреждении, а роль лектинового пути в патогенезе такого заболевания пока остается предметом дискуссии (Riedermann, N.C. et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

Последние исследования показали, что MASP-1 и MASP-3 необходимы для превращения фактора D, т.е. фермента активации альтернативного пути, из его зимогенной формы в ферментативно активную форму (см. Takahashi M. et al., *J. Exp. Med.* 207(1):29-37 (2010); Iwaki et al., *J. Immunol.* 187:3751-3758 (2011)). На физиологическую важность такого процесса указывает отсутствие функциональной активности альтернативного пути в плазме MASP-1/3-дефицитных мышей. Для функционирования альтернативного пути необходимо протеолитическое продуцирование C3b из нативного C3. Поскольку C3-конвертаза альтернативного пути (C3bBb) содержит C3b как основную субъединицу, то вопрос, касающийся происхождения первого C3b в альтернативном пути, представляется трудно разрешимым и дает стимул к проведению фундаментальных исследований.

C3 принадлежит к семейству белков (наряду с C4 и с макроглобулином α_2), которые содержат редкую посттрансляционную модификацию, известную как тиоэфирная связь. Тиоэфирная группа состоит из глутамина, у которого концевая карбонильная группа образует ковалентную тиоэфирную связь с сульфгидрильной группой цистеина без трех аминокислот. Эта связь является нестабильной, и электрофильный глутамил-тиоэфир может реагировать с нуклеофильными группами, такими как гидроксильные группы или аминогруппы, и тем самым, образовывать ковалентную связь с другими молекулами. Тиоэфирная связь является достаточно стабильной, если она секвестрирована в гидрофобном "кармане" интактного C3. Однако протеолитическое расщепление C3 на C3a и C3b приводит к "обнажению" в высокой степени реакционноспособной тиоэфирной связи на C3b, и, после нуклеофильной атаки смежными молекулами, содержащими гидроксильные группы или аминогруппы, C3b становится ковалентно связанной с мишенью. Считается, что помимо хорошо подтвержденной роли C3-тиоэфира в ковалентном связывании C3b с мишенями комплемента, C3-тиоэфир также играет главную роль в запуске альтернативного пути. В соответствии с широко распространенной "теорией холостого хода", альтернативный путь инициируется продуцированием конвертазы в жидкой фазе, iC3bBb, которая образуется из C3 под действием гидролизованного тиоэфира (iC3; C3(H₂O)) и фактора В (Lachmann P.J. et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, (1984)). The C3b-подобный C3(H₂O) продуцируется из нативного C3 посредством медленного спонтанного гидролиза внутреннего тиоэфира, присутствующего в белке (Pangburn M.K. et al., *J. Exp. Med.* 154:856-867, 1981). Благодаря активности C3 (H₂O) Bb-конвертазы молекулы C3b осаждаются на поверхности мишени, и тем самым инициируют альтернативный путь.

До раскрытия описанного здесь изобретения об инициаторах активации альтернативного пути было известно очень мало. Считается, что активаторами могут быть стенки дрожжевых клеток (зимозан), многие чистые полисахариды, кроличьи эритроциты, некоторые иммуноглобулины, вирусы, грибы, бактерии, опухолевые клетки животных, паразиты и поврежденные клетки. Единственным общим признаком этих активаторов является присутствие углевода, однако из-за сложности и разнообразия углеводных структур трудно определить общие молекулярные детерминанты для распознавания. Широко распространено мнение, что активация альтернативного пути регулируется посредством тонкого баланса между ингибирующими регуляторными компонентами этого пути, такими как фактор H, фактор I, DAF, CR1 и пропердин, который является единственным позитивным регулятором альтернативного пути (См. Schwaible W.J. and Reid K.B., *Immunol. Today* 20(1):17-21 (1999)).

Помимо явно нерегулируемого механизма активации, описанного выше, альтернативный путь может также давать петлю усиленной амплификации для C3-конвертазы (C4b2a) лектинового/классического пути, поскольку любой продуцируемый C3b может участвовать, вместе с фактором В, в образо-

вании дополнительной C3-конвертазы (C3bBbC3bBb) альтернативного пути. C3-конвертаза альтернативного пути стабилизируется посредством связывания пропердина. Пропердин способствует 6-10-кратному увеличению времени полужизни C3-конвертазы альтернативного пути. Добавление C3b к C3-конвертазе альтернативного пути способствует образованию C5-конвертазы альтернативного пути.

Считается, что все три пути (т.е. классический, лектиновый и альтернативный) сходятся в C5, который, при его расщеплении, образует продукты, обладающие множеством провоспалительных эффектов. Путь, в котором сходятся все три пути, был определен как конечный путь комплемента. C5a представляет собой исключительно сильный анафилотоксин, индуцирующий изменение тонуса гладких мышц и сосудов, а также сосудистой проницаемости. Он также является сильным хемотаксином и активатором нейтрофилов и моноцитов. C5a-опосредуемая клеточная активация может значительно усиливать воспалительные ответы посредством индуцирования высвобождения множества дополнительных медиаторов воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и молекулы активного кислорода. Расщепление C5 приводит к образованию C5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (MAC). В настоящее время существуют убедительные доказательства того, что осаждение сублитического MAC, помимо его роли как литического порообразующего комплекса, может играть важную роль в воспалительном процессе.

Система комплемента, помимо ее важной роли в иммунной защите, также вносит свой вклад в поражение ткани, наблюдаемое при многих клинических состояниях. Поэтому крайне необходимо разработать терапевтически эффективные ингибиторы комплемента, которые могли бы предупреждать указанные побочные эффекты.

Сущность изобретения

В одном из своих аспектов, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с доменом сериновой протеазы человеческой MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2) с высокой аффинностью (имеющей K_D менее, чем 500 пМ), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют активацию комплемента альтернативного пути. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются по меньшей мере одним или более из нижеследующих свойств: (a) ингибируют созревание профактора D; (b) не связываются с человеческой MASP-1 (SEQ ID NO: 8); (c) ингибируют альтернативный путь в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb) у млекопитающего; (d) не ингибируют классический путь; (e) ингибируют гемолиз и/или опсонизацию; (f) ингибируют расщепление, специфичное к субстрату сериновой протеазы MASP-3; (g) снижают степень гемолиза или степень расщепления C3 и осаждения поверхностного C3b; (h) снижают степень осаждения фактора В и/или Вb на активирующей поверхности; (i) снижают остаточные уровни (в кровотоке и без экспериментальной дополнительной активации поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; (j) снижают активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активацию поверхности; (k) снижают уровень продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a; и/или (l) снижают осаждение фактора Р. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент описаны в п.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, расположенным в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3, где указанный эпитоп расположен по меньшей мере в одной или более из: VLRSQRDDTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRDDTTV (SEQ ID NO: 10), DFNIQNYNHDIQVQ (SEQ ID NO: 11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO: 12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO: 13), VSNYVDVWWE (SEQ ID NO: 14) и/или VLRSQRDDTTV (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO: 16); RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO: 17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID NO: 18); EHVTVYLGHLH (SEQ ID NO: 19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO: 20); APHMLGL (SEQ ID NO: 21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO: 22); и/или AFDVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (a) вариативную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 209 (XXDIN, где X в положении 1 представляет собой S или T и где X в положении 2 представляет собой N или D); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, где X в положении 7 представляет собой G или D; X в положении 8 представляет собой S, T или R; X в положении 9 представляет собой I или T; X в положении 13 представляет собой E или D; X в положении 14 представляет собой K или E; и X в положении 16 представляет собой T или K); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 211 (XEDXY, где X в положении 1 представляет собой L или V, и где X в положении 4 представляет собой T или S); и (b) вариативную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, где X в положении 8 представляет собой N, I, Q или A; где X в положении 9 представляет собой S или T; и где X в положении 17 представляет собой A или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES), и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 146 (KQSYNLYT).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 213 (SYGXX, где X в положении 4 представляет собой М или I и где X в положении 5 представляет собой S или T); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 74; и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 214 (GGXAXDY, где X в положении 3 представляет собой E или D и где X в положении 5 представляет собой M или L); и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 215 (KSSQSLDSXXKTYLX, где X в положении 10 представляет собой D, E или A; где X в положении 11 представляет собой G или A; и где X в положении 16 представляет собой N или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 155; и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 216 (WQGFTHFPXT, где X в положении 8 представляет собой W или Y).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и (b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKKNYLA), SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKKNYLA); SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKKNYLA); или SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKKNYLA), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES); и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 91 (GYWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 95 (SIDY); и (b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 165 (KVSNRFS), и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 167 (SQSTHVPPT).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 109 (RVHFAIRDNTNYWMQ), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 110 (AIYPNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 112 (GSHYFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 182 (RASQSIGTSIH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 184 (YASESIS), и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 186 (QQSNSWPYT); или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 125 (DYVMN), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 127 (DVNPNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 129 (CPFYYLGKGTHFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 198 (YTSRLHS), и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 200 (QQGFTLPWT); или

(с) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 137, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 138, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 140; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 206, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 207, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 208; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 98, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 99, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 101; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 169, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 171, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 173; или

(е) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 103, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 105, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 107; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 176, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 116, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 118; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 188, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 190; или

(g) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 121, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 123; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 191, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования активации

комплемента альтернативного пути у млекопитающего, где указанный способ включает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для ингибирования активации комплемента альтернативного пути у млекопитающего. В одном из вариантов этого способа, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ. В одном из вариантов этого способа, в результате введения композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, у млекопитающих наблюдаются одно или более из нижеследующих свойств: (a) ингибирование созревания фактора D; (b) ингибирование альтернативного пути при введении индивидууму в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb); (c) отсутствие ингибирования классического пути; (d) ингибирование гемолиза и/или опсонизации; (e) снижение степени гемолиза или степени расщепления C3 и осаждения поверхностного C3b; (f) снижение осаждения фактора В и Bb на активирующей поверхности; (g) снижение остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментальной дополнительной активации поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; (h) снижение уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активацию поверхности; и/или (i) снижение уровня продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a. В одном из вариантов этого способа, композиция включает MASP-3-ингибирующее антитело, которое ингибирует альтернативный путь в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования MASP-3-зависимой активации комплемента у индивидуума, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), возрастной дегенерацией желтого пятна (ВДЖП), ишемическим-реперфузионным повреждением, артритом, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, тромботической микроангиопатией, астмой, болезнью плотных отложений, олигоиммунным некротизирующим серповидным гломерулонефритом, черепно-мозговой травмой, аспирационной пневмонией, эндофтальмитом, нейромиелином зрительного нерва или болезнью Бехчета. Этот способ включает стадию введения индивидууму композиции, содержащей высокоаффинный MASP-3-ингибирующий агент в количестве, эффективном для ингибирования MASP-3-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот способ также включает введение индивидууму композиции, содержащей MASP-2-ингибирующий агент.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу приготовления лекарственного препарата в целях его применения для ингибирования эффектов MASP-3-зависимой активации комплемента у живых индивидуумов, нуждающихся в этом, где указанный способ включает объединение терапевтически эффективного количества MASP-3-ингибирующего агента в фармацевтическом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения MASP-3-ингибирующим агентом является высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ согласно этому аспекту изобретения включает приготовление лекарственного препарата в целях его применения для ингибирования эффектов MASP-3-зависимой активации комплемента у индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, или индивидуума с риском развития заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемического-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии, астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиелиита зрительного нерва или болезни Бехчета. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот способ также включает объединение терапевтически эффективного количества MASP-3-ингибирующего агента в лекарственном препарате или с лекарственным препаратом, содержащим ингибитор MASP-3.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей физиологически приемлемый носитель и высокоаффинное MASP-3-ингибирующее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное высокоаффинное анти-MASP-3 антитело и его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), или индивидуума с риском развития пароксизмальной ночной гемоглобинурии, где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингиби-

руют активацию комплемента альтернативного пути, для лечения ПНГ или снижения риска развития ПНГ у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция повышает жизнеспособность эритроцитов у индивидуума, страдающего ПНГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума, страдающего ПНГ, или у индивидуума с риском развития ПНГ, наблюдаются один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из: (i) снижения гемоглобина до уровней ниже нормы, (ii) снижения числа тромбоцитов до уровней ниже нормы; (iii) увеличения числа ретикулоцитов до уровней выше нормы; и (iv) повышения билирубина до уровней выше нормы. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят индивидууму, страдающему ПНГ, или индивидууму с риском развития ПНГ, системно (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально или в виде ингаляции). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум, страдающий ПНГ, или индивидуум с риском развития ПНГ ранее проходил или в настоящее время проходит лечение терминальным ингибитором комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ также включает введение индивидууму терминального ингибитора комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения терминальным ингибитором комплемента является гуманизированное анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения терминальным ингибитором комплемента является экулизумаб.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего артритом или индивидуума с риском развития артрита (воспалительного и невоспалительного артрита), где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческой MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, для лечения или снижения риска развития артрита у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум страдает артритом, выбранным из группы, состоящей из остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Бехчета, артрита, ассоциированного с инфекцией и псориатического артрита. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят системно (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально или в виде ингаляции). В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят местно в сустав.

Как описано в настоящей заявке, в фармацевтических композициях согласно изобретению могут быть использованы различные варианты высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител, необязательно в комбинации с различными вариантами MASP-2-ингибирующих агентов.

Как описано в настоящей заявке, фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть использованы в соответствии со способами согласно изобретению.

Эти и другие аспекты и описанные здесь варианты осуществления изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания и описания чертежей. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, представленные в настоящем описании, во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы все они были включены в настоящее описание по-отдельности.

Описание графического материала

Вышеупомянутые аспекты изобретения и многие из описанных здесь преимуществ изобретения будут более очевидными и более понятными для специалиста из нижеследующего подробного описания, которое сопровождается прилагаемым графическим материалом, где

на фиг. 1 проиллюстрировано новое понимание лектинового и альтернативного путей;

на фиг. 2 схематически представлена диаграмма, адаптированная Schwaeble et al., Immunobiol. 205:455-466 (2002), и модифицированная Yongqing et al., BBA 1824:253 (2012), где показаны домены белков MASP-1, MASP-3 и MAp44 и экзоны, кодирующие эти домены;

на фиг. 3 проиллюстрирована аминокислотная последовательность человеческого MASP-3 (SEQ ID

NO: 2) с лидерной последовательностью, которая подчеркнута;

на фиг. 4 - выравнивание полноразмерного белка MASP-3, происходящего от различных видов;

на фиг. 5 - выравнивание домена SP белка MASP-3, происходящего от различных видов;

на фиг. 6 представлен график Каплана-Мейера, на котором проиллюстрирован процент выживаемости мышей с MASP-2-нокаутом (KO) и мышей дикого типа (WT) после введения им инфекционной дозы $2,6 \times 10^7$ к.о.е. *N.meningitidis* серологической группы A Z2491, что указывает на то, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от *N.meningitidis*-индуцированной гибели, как описано в примере 1;

на фиг. 7 - график Каплана-Мейера, на котором проиллюстрирован процент выживаемости мышей с MASP-2-нокаутом (KO) и мышей дикого типа (WT) после введения им инфекционной дозы 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, что указывает на то, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от *N.meningitidis*-индуцированной гибели, как описано в примере 1;

на фиг. 8 графически проиллюстрированы log к.о.е./мл штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58 на мл крови, взятой у мышей с MASP-2-нокаутом (KO) и мышей дикого типа (WT) в различные периоды времени после i.p.-инфицирования 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58 ($n=3$ в различные периоды времени для мышей обеих групп), что указывает на то, что, хотя мыши с MASP-2-нокаутом были инфицированы такой же дозой штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, как и мыши дикого типа, однако у мышей с MASP-2-нокаутом наблюдался усиленный клиренс бактериемии по сравнению с мышами дикого типа, как описано в примере 1;

на фиг. 9 графически проиллюстрирована средняя оценка заболеваемости мышей с MASP-2-нокаутом (KO) и мышей дикого типа (WT) через 3, 6, 12 и 24 ч после инфицирования 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, что указывает на то, что у MASP-2-дефицитных мышей, оценка заболеваемости была гораздо ниже через 6 часов, 12 часов и 24 ч после инфицирования по сравнению с мышами дикого типа, как описано в примере 1;

на фиг. 10 представлен график Каплана-Мейера, на котором проиллюстрирован процент выживаемости мышей после введения им инфекционной дозы 4×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58 с последующим введением через 3 ч после инфицирования либо MASP-2-ингибирующего антитела (1 мг/кг), либо антитела контрольного изотипа, что указывает на то, что анти-MASP-2 антитело является эффективным для лечения и повышения продолжительности жизни индивидуумов, инфицированных *N.meningitidis*, как описано в примере 2;

на фиг. 11 графически проиллюстрирован log к.о.е./мл количества жизнеспособного штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, выделенного в различные периоды времени из проб человеческой сыворотки, указанных в табл. 6 и взятых в различные периоды времени после инкубирования со штаммом *N.meningitidis* серологической группы B MC58, как описано в примере 3;

на фиг. 12 графически проиллюстрирован log к.о.е./мл количества жизнеспособного штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, выделенного в различные периоды времени из проб человеческой сыворотки, представленных в табл. 8, что указывает на то, что комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в человеческой 20% (об./об.) сыворотке является MASP-3- и MBL-зависимым, как описано в примере 3;

на фиг. 13 графически проиллюстрирован log к.о.е./мл количества жизнеспособного штамма *N.meningitidis* серологической группы B MC58, выделенного в различные периоды времени из проб мышиной сыворотки, представленных в табл. 10, что указывает на то, что сыворотка у мышей с MASP-2-нокаутом (-/-) (обозначаемых "MASP-2^{-/-}") имеет более высокий уровень бактерицидной активности по отношению к *N.meningitidis*, чем сыворотка мышей дикого типа, тогда как сыворотка MASP-1/3^{-/-}-мышей не обладала какой-либо бактерицидной активностью, как описано в примере 3;

на фиг. 14 графически проиллюстрирована кинетика активации C3 в условиях, специфичных для лектинового пути (1% плазма) в сыворотке мышей дикого типа, и у C4^{-/-}-мышей, MASP-1/3^{-/-}-мышей, фактор В^{-/-}-мышей и MASP-2^{-/-}-мышей, как описано в примере 4;

на фиг. 15 графически проиллюстрирован уровень осаждения C3b, индуцированного по альтернативному пути (АП-индуцированному) на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в "традиционных" условиях, специфичных к альтернативному пути (АП-специфичных) (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у человека с дефицитом MASP-3, C4 и MBL, как описано в примере 4;

на фиг. 16 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) в зависимости от времени в пробах 10% человеческой сыворотки, взятых у человека с дефицитом MASP-3, C4 и MBL, как описано в примере 4;

на фиг. 17А графически проиллюстрирован уровень осаждения C3b на покрытых маннаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, у MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (АП) (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), как описано в

примере 4;

на фиг. 17В графически проиллюстрирован уровень осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, у MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (АП) (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), как описано в примере 4;

на фиг. 17С графически проиллюстрирован уровень осаждения C3b на микротитрационных планшетах, покрытых *S.pneumoniae* D39, в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, у MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (АП) (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), как описано в примере 4;

на фиг. 18А графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение C3b в сыворотке с высоким разведением, осуществляемого на микротитрационных планшетах, покрытых маннаном, в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (АП) (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0 до 1,25%, как описано в примере 4;

на фиг. 18В графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение C3b, осуществляемого на микротитрационных планшетах, покрытых зимозаном, в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0% до 1,25%, как описано в примере 4;

на фиг. 18С графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение C3b, осуществляемого на микротитрационных планшетах, покрытых *S.pneumoniae* D39, в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) или в физиологических условиях, благоприятных для функции лектинового пути и альтернативного пути (BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0 до 1,25%, как описано в примере 4;

на фиг. 19 графически проиллюстрирован уровень гемолиза (измеренного по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами (Cгу/C3-/-) в супернатант посредством фотометрии), покрытых маннаном мышинных эритроцитов в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca⁺⁺) в разведениях человеческой MASP-3^{-/-}-сыворотки, термоинактивированной нормальной человеческой сыворотки (HI NHS), MBL^{-/-}-сыворотки, NHS+моноклональное анти-MASP-2 антитело и NHS-контроля, как описано в примере 5;

на фиг. 20 графически проиллюстрирован уровень гемолиза (измеренного по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами (Cгу/C3-/-) в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном мышинных эритроцитов в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca⁺⁺) в разведениях человеческой MASP-3^{-/-}-сыворотки, термоинактивированной сыворотки (HI NHS), MBL^{-/-}-сыворотки, NHS+моноклональное анти-MASP-2 антитело и NHS-контроля, как описано в примере 5;

на фиг. 21 графически проиллюстрирован уровень гемолиза (измеренного по высвобождению гемоглобина лизированными эритроцитами мышей дикого типа в супернатант посредством фотометрии) мышинных эритроцитов без покрытия в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca⁺⁺) в разведениях человеческой 3MC (MASP-3^{-/-}-сыворотки), термоинактивированной сыворотки (HI NHS), MBL^{-/-}-сыворотки, NHS+моноклональное анти-MASP-2 антитело и NHS-контроля, как описано в примере 5;

на фиг. 22 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами (CD55/59-/-) в супернатант посредством фотометрии) мышинных эритроцитов без покрытия в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca⁺⁺) в разведениях человеческой термоинактивированной сыворотки (HI NHS), MBL^{-/-}-сыворотки, NHS+моноклональное анти-MASP-2 антитело и NHS-контроля, как описано в примере 5;

на фиг. 23 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов в мышинной MASP-3^{-/-}-сыворотке и в сыворотке контрольных мышей дикого типа в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca⁺⁺) в концентрациях сыворотки, описанных в примере 6;

на фиг. 24А представлена FACS-гистограмма связывания антигена MASP-3/антитела для клона M3J5, как описано в примере 7;

на фиг. 24В - FACS-гистограмма связывания антигена MASP-3/антитела для клона M3M1, как описано в примере 7;

на фиг. 25 графически проиллюстрирована кривая насыщенного связывания клона M3J5 (клона 5) с антигеном MASP-3, как описано в примере 7;

на фиг. 26А показано выравнивание аминокислотной последовательности VH-областей M3J5, M3M1, D14 и 1E10 и последовательности VH куриного DT40, где точками показаны аминокислоты, идентичные аминокислотам последовательности DT40, а пунктиром показаны области, введенные для

максимизации выравнивания, как описано в примере 7;

на фиг. 26B - выравнивание аминокислотной последовательности VL-областей M3J5, M3M1, D14 и 1E10 и последовательности VL куриного DT40, где точками показаны аминокислоты, идентичные аминокислотам последовательности DT40, а пунктиром показаны области, введенные для максимизации выравнивания, как описано в примере 7;

на фиг. 27 представлена гистограмма, иллюстрирующая ингибирующую активность моноклонального антитела (mAb) 1E10 при скрининге системы комплемента Wieslab в отношении MBL-пути по сравнению с позитивной сывороткой, имеющейся в наборе для анализа, а также иллюстрирующая ингибирующую активность антитела контрольного изотипа, что указывает на то, что mAb1E10 частично ингибирует LEA-2-зависимую активацию (посредством ингибирования MASP-1-зависимой активации MASP-2), тогда как антитело контрольного изотипа не обладает такой активностью, как описано в примере 7;

на фиг. 28A - результаты проточного цитометрического анализа на осаждение C3b в термоинактивированной *Staphylococcus aureus*, что указывает на то, что в нормальной человеческой сыворотке в присутствии EDTA, которая, как известно, инактивирует лектиновые и альтернативные пути, осаждения C3b не наблюдалось (панель 1); в нормальной человеческой сыворотке, обработанной $Mg^{++}/EGTA$, наблюдалось осаждение C3b, индуцированное по альтернативному пути (панель 2), а как показано на панелях 3, 4 и 5, в сыворотке, дефицитной по фактору В, фактору D и пропердину (фактору Р), соответственно, осаждения C3b, индуцированного по альтернативному пути, не наблюдалось, как описано в примере 8;

на фиг. 28B - результаты проточного цитометрического анализа на осаждение C3b в термоинактивированной *S.aureus*, что указывает на то, что как и в EDTA-обработанной нормальной сыворотке (панель 1), в сыворотке ЗМС, АП-индуцированного осаждения C3b не наблюдалось в присутствии $Mg^{++}/EGTA$ (панель 3), а на панелях 4 и 5 показано, что активный полноразмерный гMASP-3 (панель 4) и активный гMASP-3 (CCP1-CCP2-SP) (панель 5) сохраняли уровни АП-индуцированного осаждения C3b в сыворотке ЗМС, на уровнях, наблюдаемых в нормальной сыворотке, обработанной $Mg^{++}/EGTA$ (панель 2); при этом неактивный гMASP-3 (S679A) (панель 6) и гMASP-1 дикого типа (панель 7) не могли сохранять уровень АП-индуцированного осаждения C3b в сыворотке ЗМС, как описано в примере 8;

на фиг. 29 - результаты вестерн-блот-анализа для определения расщепления фактора В в ответ на *S.aureus* в сыворотке ЗМС в присутствии или в отсутствии гMASP-3, что указывает на то, что нормальная человеческая сыворотка в присутствии EDTA (негативный контроль, дорожка 1) демонстрирует очень низкий уровень расщепления фактора В по сравнению с нормальной человеческой сывороткой в присутствии $Mg^{++}/EGTA$, как показано на дорожке 2 (позитивный контроль) и на дорожке 3; а сыворотка ЗМС демонстрирует очень низкий уровень расщепления фактора В в присутствии $Mg^{++}/EGTA$. Однако, как показано на дорожке 4, расщепление фактора В поддерживается за счет добавления и предварительного инкубирования полноразмерного рекомбинантного белка MASP-3 с сывороткой ЗМС, как описано в примере 8;

на фиг. 30 показано кумасси-окрашивание геля белка, где анализируют расщепление фактора В, и этот анализ показал, что расщепление фактора В является наиболее оптимальным в присутствии C3, MASP-3 и про-фактора D (дорожка 1), и как показано на дорожках 4 и 5, MASP-3 или про-фактор D, взятые отдельно, способны опосредовать расщепление фактора В при условии, что будет присутствовать C3, как описано в примере 8;

на фиг. 31 графически проиллюстрированы средние интенсивности флуоресценции (MFI) окрашивания C3b *S. aureus*, полученного от mAbD14 (которое связывается с MASP-3), mAb1A5 (антитела негативного контроля) и антитела контрольного изотипа в зависимости от концентрации mAb в сыворотке ЗМС в присутствии гMASP-3, что указывает на то, что mAbD14 ингибирует MASP-3-зависимое осаждение C3b в зависимости от концентрации, как описано в примере 8;

на фиг. 32 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ на расщепление субстрата про-фактора D, где по сравнению с про-фактором D, взятым отдельно (дорожка 1) или с неактивным полноразмерным рекомбинантным MASP-3 (S679A; дорожка 3) или MASP-1 (S646A; дорожка 4), полноразмерный рекомбинантный MASP-3 дикого типа (дорожка 2) и MASP-1 (дорожка 5) полностью или частично расщепляют про-фактор D с образованием зрелого фактора D, как описано в примере 9;

на фиг. 33 представлен вестерн-блот-анализ, иллюстрирующий ингибирующую активность MASP-3-связывающихся mAb D14 (дорожка 2) и M3M1 (дорожка 3) в отношении MASP-3-зависимого расщепления про-фактора D по сравнению с контрольной реакционной смесью, содержащей только MASP-3 и про-фактор D (без mAb, дорожка 1), а также с контрольной реакционной смесью, содержащей mAb, выделенное из библиотеки DTLacO и связывающееся с MASP-1, но не с MASP-3 (дорожка 4), как описано в примере 9;

на фиг. 34 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у индивидуумов с дефицитом MASP-3 (ЗМС), C4 и MBL, что указывает на то, что MASP-3-дефицитная сыворотка, взятая у пациента 2 и пациента 3, имеет остаточную АП-активность при высоких концентрациях сыворотки (25, 12,5, 6,25% концентрации сыворотки), и значительно более вы-

сокую АП₅₀ (т.е. для достижения 50% от максимального осаждения СЗ необходима 8,2 и 12,3% сыворотка), как описано в примере 10;

на фиг. 35А графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения СЗb на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) в зависимости от времени в пробах 10% человеческой сыворотки, взятых у человека с дефицитом MASP-3, С4 и MBL, как описано в примере 10;

на фиг. 35В проиллюстрирован вестерн-блот-анализ плазмы, взятой у ЗМС-пациента #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)), ЗМС-пациента #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), и сыворотки, взятой у нормальных доноров (W), где человеческой про-фактор D (25040 Да) и/или мышинный фактор D (24405 Да) детектировали с использованием антитела, специфичного к человеческому фактору D, как описано в примере 10;

на фиг. 35С графически проиллюстрированы результаты анализов классического, лектинового и альтернативного пути Weislab в плазме, взятой у ЗМС-пациента #2, ЗМС-пациента #3, и в нормальной человеческой сыворотке, как описано в примере 10;

на фиг. 36 графически проиллюстрирован процент гемолиза (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов в определенных концентрациях сыворотки, взятой у двух здоровых людей (NHS) и у двух ЗМС-пациентов (пациента 2 и пациента 3), в отсутствии Ca⁺⁺, что указывает на то, что дефицит MASP-3 приводит к снижению процента комплемент-опосредуемого лизиса покрытых маннаном эритроцитов по сравнению с нормальной человеческой сывороткой, как описано в примере 10;

на фиг. 37 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения СЗb на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации рекомбинантного полно-размерного белка MASP-3, добавленного в пробу сыворотки, взятой у ЗМС-пациента 2 (MASP-3^{-/-}), что указывает на то, что по сравнению с неактивным рекомбинантным MASP-3 (MASP-3A; S679A), используемым в качестве негативного контроля, активный рекомбинантный белок MASP-3 восстанавливает АП-индуцированное осаждение СЗb на покрытых зимозаном планшетах в зависимости от концентрации, как описано в примере 10;

на фиг. 38 графически проиллюстрирован процент гемолиза (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов в определенных концентрациях сыворотки: (1) в нормальной человеческой сыворотке (NHS); (2) в сыворотке ЗМС-пациента; (3) в сыворотке ЗМС-пациента, содержащей активный полноразмерный рекомбинантный MASP-3 (20 мкг/мл); и (4) в термоинактивированной человеческой сыворотке (HIS) в отсутствии Ca⁺⁺, что указывает на то, что процент лизиса кроличьих эритроцитов значительно увеличивается в ЗМС-сыворотке, содержащей rMASP-3 по сравнению с процентом лизиса в ЗМС-сыворотке, не содержащей рекомбинантного MASP-3 (p=0,0006), как описано в примере 10;

на фиг. 39 графически проиллюстрирован процент лизиса кроличьих эритроцитов в 7% человеческой сыворотке, взятой у ЗМС-пациента 2 и ЗМС-пациента 3 и содержащей активный рекомбинантный MASP-3 в концентрации от 0 до 110 мкг/мл (в BBS/Mg⁺⁺/EGTA), что указывает на то, что процент лизиса кроличьих эритроцитов увеличивается по мере увеличения количества рекомбинантного MASP-3 в зависимости от концентрации, как описано в примере 10;

на фиг. 40 графически проиллюстрирован уровень LEA-2-индуцированного осаждения СЗb на покрытых маннаном ELISA-планшетах в зависимости от концентрации человеческой сыворотки, разведенной в буфере BBS и взятой у здорового человека (NHS); у двух ЗМС-пациентов (пациента 2 и пациента 3); у родителей пациента 3 и у индивидуума с дефицитом MBL, как описано в примере 10;

на фиг. 41 графически проиллюстрирован репрезентативный пример эксперимента по связыванию, который был проведен с использованием человеческого MASP-3, где Fab M3-1 (также обозначаемый 13B1) связывался с человеческим белком с кажущейся аффинностью связывания (EC₅₀) приблизительно 0,117 nM, как описано в примере 11;

на фиг. 42 графически проиллюстрирован репрезентативный пример эксперимента по связыванию, который был проведен с использованием мышинового MASP-3, где Fab M3-1 (также обозначаемый 13B1) связывался с мышинным белком с кажущейся аффинностью связывания (EC₅₀) приблизительно 0,214 nM, как описано в примере 11;

на фиг. 43 графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Вb комплемента на частицах зимозана (определенный посредством цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций mAb M3-1 (также обозначаемого 13B1) в CFD-дефицитной человеческой сыворотке, как описано в примере 11;

на фиг. 44 графически проиллюстрирован уровень осаждения СЗ на частицах зимозана в различные периоды времени после введения одной дозы mAb M3-1 (13B1) (10 мг/кг i.v.) мышам дикого типа, как описано в примере 11;

на фиг. 45 графически проиллюстрирован процент выживших донорных RBC (дикого типа или Cту-) в течение 14 дней у мышей-реципиентов дикого типа, обработанных mAb M3-1 (13B1) (10 мг/кг на дни -11, 04, -1 и +6), у мышей, обработанных mAb BB5.1 или мышей, обработанных носителем, как описано в примере 12;

на фиг. 46 графически проиллюстрирован процент выживших донорных RBC (дикого типа или Crgy-) в течение 16 дней у мышей-реципиентов дикого типа, обработанных одной дозой mAb M3-1 (13B1) (20 мг/кг на день -6), или мышей, обработанных носителем, как описано в примере 12;

на фиг. 47 графически проиллюстрированы клинические оценки для мышей, обработанных mAb M3-1 (13B1) (5 или 20 мг/кг) или мышей, обработанных носителем в течение 14 дней, с моделью артрита, индуцированного антителом против коллагена, как описано в примере 13;

на фиг. 48 графически проиллюстрирован процент заболеваемости артритом у мышей, обработанных mAb M3-1 (13B1) (5 или 20 мг/кг) или у мышей, обработанных носителем в течение 14 дней, с моделью артрита, индуцированного антителом против коллагена, как описано в примере 13;

на фиг. 49A представлены аминокислотные последовательности VH-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3 (<500 пМ), как описано в примере 15;

на фиг. 49B – аминокислотные последовательности VL-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3 (<500 пМ), как описано в примере 15;

на фиг. 50A – дендрограмма VH-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3, как описано в примере 15;

на фиг. 50B – дендрограмма VL-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3, как описано в примере 15;

на фиг. 51A графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, связываются с человеческим белком MASP-3 с кажущейся авидностью связывания менее, чем 500 пМ (например, от 240 до 23 пМ), как описано в примере 16;

на фиг. 51B графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, связываются с человеческим белком MASP-3 с кажущейся авидностью связывания менее, чем 500 пМ (например, от 91 до 58 пМ), как описано в примере 16;

на фиг. 51C графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные высокоаффинные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, селективно связываются с MASP-3, но не связываются с человеческим MASP-1, как описано в примере 16;

на фиг. 51D графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные высокоаффинные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, селективно связываются с MASP-3, но не связываются с человеческим MASP-2, как описано в примере 16;

на фиг. 52 графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, также обнаруживают высокую авидность связывания с мышинным белком MASP-3, как описано в примере 16;

на фиг. 53 графически проиллюстрированы результаты эксперимента по оценке способности репрезентативных высокоаффинных анти-MASP-3 антител ингибировать расщепление флуорогенного трипептида, как описано в примере 16;

на фиг. 54 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ, указывающий на способность репрезентативных высокоаффинных MASP-3-ингибирующих mAb блокировать расщепление про-фактора D, опосредуемое рекомбинантным MASP-3 с образованием фактора D в анализе *in vitro*, как описано в примере 16;

на фиг. 55A графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Bb комплемента на частицах зимозана (определенный посредством проточного цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций высокоаффинных анти-MASP-3 mAb 1F3, 1G4, 2D7 и 4B6 в человеческой сыворотке с дефицитом фактора D, как описано в примере 16;

на фиг. 55B графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Bb комплемента на частицах зимозана (определенный посредством проточного цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций высокоаффинных анти-MASP-3 mAb 4D5, 10D12 и 13B1 в человеческой сыворотке с дефицитом фактора D, как описано в примере 16;

на фиг. 56A графически проиллюстрирован уровень ингибирования лизиса кроличьих эритроцитов в присутствии различных концентраций высокоаффинных анти-MASP-3 mAb 1A10, 1F3, 4B6, 4D5 и 2F2, как описано в примере 16;

на фиг. 56B графически проиллюстрирован уровень ингибирования лизиса кроличьих эритроцитов в присутствии различных концентраций высокоаффинных анти-MASP-3 mAb 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 и 2F5 как описано в примере 16;

на фиг. 57 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения уровня про-фактора D и фактора D в сыворотке ЗМС-пациента (пациента В) в присутствии активного рекомбинантного MASP-3 (гMASP-3), неактивного гMASP-3 и активного гMASP-3 плюс высокоаффинное анти-MASP-3 mAb 4D5, как описано в примере 16;

на фиг. 58 графически проиллюстрирован уровень осаждения C3/C3b/iC3b на частицах зимозана в различные периоды времени после введения одной дозы высокоаффинных анти-MASP-3 mAb M3-1

(13B1, 10 мг/кг) или 10D12 (10 мг/кг) у мышей дикого типа, как описано в примере 17;

на фиг. 59 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения статуса фрагмента Ba фактора В у мышей, обработанных высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 10D12 (10 мг/кг) или у мышей, обработанных носителем-контролем, как описано в примере 17;

на фиг. 60 графически проиллюстрирован уровень ингибирования гемолиза 20% сывороткой мышей, обработанных высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 10D12 (10 мг/кг или 25 мг/кг), как описано в примере 17;

на фиг. 61A графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации высокоаффинных анти-MASP-3 mAb, которые блокируют взаимодействие между высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 4D5 и человеческим MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 61B графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации высокоаффинных анти-MASP-3 mAb, которые блокируют взаимодействие между высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 10D12 и человеческим MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 61C графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации высокоаффинных анти-MASP-3 mAb, которые блокируют взаимодействие между высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 13B1 и человеческим MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 61D графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации высокоаффинных анти-MASP-3 mAb, которые блокируют взаимодействие между высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 1F3 и человеческим MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 61E графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации высокоаффинных анти-MASP-3 mAb, которые блокируют взаимодействие между высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 1G4 и человеческим MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 62 схематически представлена диаграмма, иллюстрирующая области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb, определенные с помощью анализа Perscap, как описано в примере 18;

на фиг. 63A представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb 1F3, 4D5 и 1A10, включающими аминокислотные остатки 498-509 (SEQ ID NO: 9), аминокислотные остатки 544-558 (SEQ ID NO: 11), аминокислотные остатки 639-649 (SEQ ID NO: 13) и аминокислотные остатки 704-713 (SEQ ID NO: 14) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 63B - области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 10D12, включающим аминокислотные остатки 498-509 (SEQ ID NO: 9) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 64 - области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 13B1, включающим аминокислотные остатки 494-508 (SEQ ID NO: 10) и аминокислотные остатки 626-638 (SEQ ID NO: 12) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 65 - области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 1B11, включающим аминокислотные остатки 435-447 (SEQ ID NO: 16), аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 583-589 (SEQ ID NO: 21) и аминокислотные остатки 614-623 (SEQ ID NO: 22) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 66 - области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb 1E7, 1G4 и 2D7, включающими аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 514-523 (SEQ ID NO: 19) и аминокислотные остатки 667-678 (SEQ ID NO: 23) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 67 - области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb 15D9 и 2F5, включающими аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 479-493 (SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 562-571 (SEQ ID NO: 20), и аминокислотные остатки 667-678 (SEQ ID NO: 23) MASP-3, как описано в примере 18;

на фиг. 68 графически проиллюстрированы результаты анализа на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей, обработанных высокоаффинным MASP-3-ингибирующим mAb 13B1 (10 мг/кг), mAb против фактора В 1379 (30 мг/кг) или mAb контрольного изотипа (10 мг/кг), как описано в примере 20;

на фиг. 69 графически проиллюстрирована APC-активность, определенная по средней MFI в проточном цитометрическом анализе для детектирования фактора Bb комплемента на поверхности частиц зимозана в пробах сыворотки, взятых у группы из трех собакоподобных обезьян в течение определенного периода времени после обработки высокоаффинным анти-MASP-3 mAb h13B1X в отсутствие антитела против фактора D, либо в присутствии антитела против фактора D, введенного в пробу сыворотки, как описано в примере 21;

на фиг. 70 графически проиллюстрирована APC-активность, определенная по осаждению Bb на зимозане, в пробах сыворотки, взятых у группы собакоподобных обезьян (3 животных на группу), обработанных одной внутривенной дозой 5 мг/кг высокоаффинных MASP-3-ингибирующих mAb h4D5X, h10D12X или h13B1X, как описано в примере 21;

на фиг. 71A графически проиллюстрирована APC-активность, определенная по осаждению жидко-

фазного Ba в пробах сыворотки, взятых у группы собакоподобных обезьян (3 животных на группу) после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг mAb h4D5X, h10D12X, и h13B1X, как описано в примере 21;

на фиг. 71B графически проиллюстрирована APC-активность, определенная по осаждению жидкофазного Bb в пробах сыворотки, взятых у групп собакоподобных обезьян (3 животных на группу) в течение определенного периода времени после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг mAb h4D5X, h10D12X, и h13B1X, как описано в примере 21;

на фиг. 71C графически проиллюстрирована APC-активность, определенная по осаждению жидкофазного C3a в пробах сыворотки, взятых у групп собакоподобных обезьян (3 животных на группу) в течение определенного периода времени после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг mAb h4D5X, h10D12X и h13B1X, как описано в примере 21;

на фиг. 72A графически проиллюстрировано молярное отношение мишени (MASP-3) к высокоаффинному MASP-3-ингибирующему антителу h4D5X в определенные моменты времени после завершения ингибирования APC, как было определено с использованием жидкофазного Ba и как описано в примере 21;

на фиг. 72B графически проиллюстрировано молярное отношение мишени (MASP-3) к высокоаффинному MASP-3-ингибирующему антителу h10D12X в определенные моменты времени после завершения ингибирования APC, как было определено с использованием жидкофазного Ba и как описано в примере 21;

на фиг. 72C графически проиллюстрировано молярное отношение мишени (MASP-3) к высокоаффинному MASP-3-ингибирующему антителу h13B1X в определенные моменты времени после завершения ингибирования APC, как было определено с использованием жидкофазного Ba и как описано в примере 21;

на фиг. 73 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения уровня про-фактора D и фактора D в сыворотке, взятой у собакоподобной обезьяны в течение определенного периода времени (часы) после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг mAb h13B1X, как описано в примере 21.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1: кДНК человеческого MASP-3;

SEQ ID NO: 2: человеческий белок MASP-3 (с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 3: мышинный белок MASP-3 (с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 4: крысиный белок MASP-3;

SEQ ID NO: 5: куриный белок MASP-3;

SEQ ID NO: 6: кроличий белок MASP-3;

SEQ ID NO: 7: белок MASP-3 собакоподобных обезьян;

SEQ ID NO: 8: человеческий белок MASP-1 (с лидерной последовательностью).

Фрагменты пептидного домена SP человеческого MASP-3:

SEQ ID NO: 9 (а.к. 498-509 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 10 (а.к. 494-508 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 11 (а.к. 544-558 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 12 (а.к. 626-638 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 13 (а.к. 639-649 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 14 (а.к. 704-713 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 15 (а.к. 498-508 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 16 (а.к. 435-447 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 17 (а.к. 454-464 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 18 (а.к. 479-493 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 19 (а.к. 514-523 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 20 (а.к. 562-571 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 21 (а.к. 583-589 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 22 (а.к. 614-623 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 23 (а.к. 667-678 человеческого MASP-3 с лидерной последовательностью);

SEQ ID NO: 24-39: родительские мышинные вариабельные области тяжелой цепи:

SEQ ID NO: 24 4D5_VH;

SEQ ID NO: 25 1F3_VH;

SEQ ID NO: 26 4B6_VH;

SEQ ID NO: 27 1A10_VH;

SEQ ID NO: 28 10D12_VH;

SEQ ID NO: 29 35C1_VH;

SEQ ID NO: 30 13B1_VH;

SEQ ID NO: 31 1G4_VH;

SEQ ID NO: 32 1E7_VH;

SEQ ID NO: 33 2D7_VH;

SEQ ID NO: 34 49C11_VH;

SEQ ID NO: 35 15D9_VH;

SEQ ID NO: 36 2F5_VH;
 SEQ ID NO: 37 1B11_VH;
 SEQ ID NO: 38 2F2_VH;
 SEQ ID NO: 39 11B6_VH;
 SEQ ID NO: 40-54: родительские мышинные вариабельные области легкой цепи:
 SEQ ID NO: 40 4D5_VL;
 SEQ ID NO: 41 1F3_VL;
 SEQ ID NO: 42 4B6/1A10_VL;
 SEQ ID NO: 43 10D12_VL;
 SEQ ID NO: 44 35C1_VL;
 SEQ ID NO: 45 13B1_VL;
 SEQ ID NO: 46 1G4_VL;
 SEQ ID NO: 47 1E7_VL;
 SEQ ID NO: 48 2D7_VL;
 SEQ ID NO: 49 49C11_VL;
 SEQ ID NO: 50 15D9_VL;
 SEQ ID NO: 51 2F5_VL;
 SEQ ID NO: 52 1B11_VL;
 SEQ ID NO: 53 2F2_VL;
 SEQ ID NO: 54 11B6_VL;
 SEQ ID NO: 55-140: каркасные области тяжелой цепи (FR) и гипервариабельные области (CDR) мышинных родительских анти-MASP-3 mAb;
 SEQ ID NO: 141-208: FR и CDR легкой цепи мышинных родительских анти-MASP-3 mAb;
 SEQ ID NO: 209-216: консенсусные последовательности CDR;
 SEQ ID NO: 217-232: ДНК, кодирующая вариабельные области тяжелой цепи (мышинного родительского антитела);
 SEQ ID NO: 233-247: ДНК, кодирующая вариабельные области легкой цепи (мышинного родительского антитела);
 SEQ ID NO: 248: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 4D5_VH-14 (h4D5_VH-14);
 SEQ ID NO: 249: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 4D5_VH-19 (h4D5_VH-19);
 SEQ ID NO: 250: вариабельная область легкой цепи гуманизированного 4D5_VL-1 (h4D5_VL-1);
 SEQ ID NO: 251: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 10D12_VH-45 (h10D12_VH-45);
 SEQ ID NO: 252: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 10D12_VH-4 9 (h10D12_VH-49);
 SEQ ID NO: 253: вариабельная область легкой цепи гуманизированного 10D12_VL-21 (h10D12-VL-21);
 SEQ ID NO: 254: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 13B1_VH-9 (h13B1-VH-9);
 SEQ ID NO: 255: вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 13B1_VH-10 (h13B1-VH-10);
 SEQ ID NO: 256: вариабельная область легкой цепи гуманизированного 13B1-VL-1 (h13B1-VL-1);
 SEQ ID NO: 257: 4D5 и 13B1 LC-CDR1-NQ;
 SEQ ID NO: 258: 4D5 и 13B1 LC-CDR1-NA;
 SEQ ID NO: 259: 4D5 и 13B1 LC-CDR1-ST;
 SEQ ID NO: 260: консенсусная LC-CDR1 для родительских антител 4D5, 13B1 и их вариантов;
 SEQ ID NO: 261: 10D12 LC-CDR1-DE;
 SEQ ID NO: 262: 10D12 LC-CDR1-DA;
 SEQ ID NO: 263: 10D12 LC-CDR1-GA;
 SEQ ID NO: 264-277: HC FR и CDR для гуманизированных 4D5, 10D12 и 13B1;
 SEQ ID NO: 278: h4D5_VL-1-NA;
 SEQ ID NO: 279: h10D12_VL-21-GA;
 SEQ ID NO: 280: h13B1_VL-1-NA;
 SEQ ID NO: 281-287 LC FR и CDR для гуманизированных 4D5, 10D12 и 13B1;
 SEQ ID NO: 288-293: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированных 4D5, 10D12, 13B1 и их варианты;
 SEQ ID NO: 294-299: ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи гуманизированных 4D5, 10D12, 13B1 и их варианты;
 SEQ ID NO: 300: полипептид вариабельной области тяжелой цепи (VH) родительского DTLacO;
 SEQ ID NO: 301: полипептид вариабельной области тяжелой цепи (VH) MASP-3-специфического

клона M3J5;

SEQ ID NO: 302: полипептид варибельной области тяжелой цепи (VH) MASP-3-специфического клона M3M1;

SEQ ID NO: 303: полипептид варибельной области легкой цепи (VL) родительского DTLacO;

SEQ ID NO: 304: полипептид варибельной области легкой цепи (VL) MASP-3-специфического клона M3J5;

SEQ ID NO: 305: полипептид варибельной области легкой цепи (VL) MASP-3-специфического клона M3M1;

SEQ ID NO: 306: полипептид варибельной области тяжелой цепи (VH) MASP-3-специфического клона D14;

SEQ ID NO: 307: полипептид варибельной области легкой цепи (VL) MASP-3-специфического клона D14;

SEQ ID NO: 308: полипептид варибельной области тяжелой цепи (VH) MASP-1-специфического клона 1E10;

SEQ ID NO: 309: полипептид варибельной области легкой цепи (VL) MASP-1-специфического клона 1E10;

SEQ ID NO: 310: константная область человеческого IgG4;

SEQ ID NO: 311: константная область человеческого IgG4 с мутацией S228P;

SEQ ID NO: 312: константная область человеческого IgG4 с мутацией_X S228P;

SEQ ID NO: 313: константная область человеческого IgK.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь термины имеют свое общепринятое значение, понятное среднему специалисту в данной области. Нижеследующие определения представлены для лучшего понимания терминов, используемых в описании и в формуле изобретения.

Используемый здесь термин "эффекторная цепь лектинового пути 1 ("LEA-1") означает лектин-зависимую активацию фактора В и фактора D под действием MASP-3.

Используемый здесь термин "эффекторная цепь лектинового пути 2 ("LEA-2") означает MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Используемый здесь термин "MASP-3-зависимая активация комплемента" включает два компонента: (i) MASP-3-зависимую активацию лектинового пути для фактора В и фактора D, которая охватывает LEA-1-опосредованную активацию комплемента в присутствии Ca^{++} , который обычно приводит к превращению C3bB в C3bBbC3bBb и про-фактора D в фактор D; и (ii) лектин-независимое превращение фактора В и фактора D, которое может происходить в отсутствие Ca^{++} и обычно приводит к превращению C3bB в C3bBbC3bBb и про-фактора D в фактор D. Было определено, что LEA-1-опосредованная активация комплемента и лектин-независимое превращение фактора В и фактора D вызывают опсонизацию и/или лизис. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что только в том случае, когда множество молекул C3b ассоциируются и связываются друг с другом в непосредственной близости, C3-конвертаза C3bBbC3bBb изменяет свою специфичность к субстрату и расщепляет C5 как C5-конвертаза альтернативного пути, называемая C3bBbC3bBb(C3b)n.

Используемый здесь термин "MASP-2-зависимая активация комплемента", также называемая здесь LEA-2-опосредованной активацией комплемента, включает лектин-зависимую активацию MASP-2, которая происходит в присутствии Ca^{++} , что приводит к образованию C3-конвертазы лектинового пути C4b2a и после аккумуляции продукта C3-расщепления C3b образуется C5-конвертаза C4b2a(C3b)n, которая, как было определено, вызывает опсонизацию и/или лизис.

Используемый здесь термин "традиционное понимание альтернативного пути", также называемый здесь "традиционным альтернативным путем" относится к альтернативному пути, описанному еще до раскрытия настоящего изобретения, т.е. к активации комплемента, которая запускается, например, зимозаном стенок клеток грибов и дрожжевых клеток, липополисахаридом (ЛПС) внешних мембран грамотрицательных бактерий и кроличьих эритроцитов, а также многими чистыми полисахаридами, вирусами, бактериями, опухолевыми клетками животных, паразитами и поврежденными клетками, и которая, как традиционно считалось, вызывается спонтанной протеолитической генерацией C3b из фактора C3 комплемента. Используемую здесь активацию "традиционного альтернативного пути", также упоминаемого здесь как "альтернативный путь", оценивают в Mg^{++} /EGTA-буфере (т.е. в отсутствие Ca^{++}).

Используемый здесь термин "лектиновый путь" относится к активации комплемента, которая происходит посредством специфического связывания сывороточных и несывороточных углеводсвязывающих белков, включая маннан-связывающий лектин (MBL), CL-11 и фиколины (Н-фиколин, М-фиколин или L-фиколин). Как описано в настоящей заявке, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что лектиновый путь запускается двумя эффекторными путями, такими как эффекторная цепь лектинового пути 1 (LEA-1), которая, как теперь известно, является MASP-3-зависимой, и эффекторная цепь лектинового пути 2 (LEA-2), которая является MASP-2-зависимой. Описанную здесь активацию лектиновых путей оценивают с использованием Ca^{++} -содержащих буферов.

Используемый здесь термин "классический путь" относится к активации комплемента, которая запускается антителом, связанным с чужеродной частицей, и требует связывания с молекулой распознавания C1q.

Используемый здесь термин "HTRA-1" означает сериновую пептидазу, которая при высокой температуре превращается в сериновую протеазу A1.

Используемый здесь термин "MASP-3-ингибирующий агент" означает любой агент, который непосредственно ингибирует MASP-3-зависимую активацию комплемента, включая агенты, которые связываются или непосредственно взаимодействуют с MASP-3, включая анти-MASP-3 антитела и их MASP-3-связывающие фрагменты, природные и синтетические пептиды, конкурентные субстраты, небольшие молекулы, ингибиторы экспрессии и отдельные природные ингибиторы, а также пептиды, которые конкурируют с MASP-3 за связывание с другой молекулой распознавания (например, MBL, CL-11, Н-фиколином, М-фиколином или L-фиколином) в лектиновом пути. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-3-ингибирующий агент является специфичным к MASP-3 и не связывается с MASP-1 или MASP-2. Ингибирующий агент, который непосредственно ингибирует MASP-3, может называться агентом, непосредственно ингибирующим MASP-3 (например, анти-MASP-3 антителом), а ингибирующий агент, который опосредованно ингибирует MASP-3, может называться агентом, опосредованно ингибирующим MASP-3 (например, анти-MASP-1 антителом, которое ингибирует активацию MASP-3). Примером агента, непосредственно ингибирующего MASP-3, является агент, специфически ингибирующий MASP-3, такой как MASP-3-ингибирующий агент, который специфически связывается с частью человеческого MASP-3 (SEQ ID NO: 2) с аффинностью связывания, по меньшей мере в 10 раз превышающей аффинность связывания с другими компонентами системы комплемента. Другим примером агента, непосредственно ингибирующего MASP-3, является высокоаффинное анти-MASP-3 антитело, которое специфически связывается с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 (SEQ ID NO: 2), с аффинностью менее чем 500 мкМ и не связывается с человеческим MASP-1 (SEQ ID NO: 8). В одном варианте осуществления изобретения MASP-3-ингибирующий агент опосредованно ингибирует активность MASP-3, например, таким агентом является ингибитор активации MASP-3, включая ингибитор MASP-1-опосредованной активации MASP-3 (например, анти-MASP-1 антитело или его MASP-1-связывающие фрагменты, природные и синтетические пептиды, небольшие молекулы, ингибиторы экспрессии и отдельные природные ингибиторы, а также пептиды, которые конкурируют с MASP-1 за связывание с MASP-3). В предпочтительном варианте осуществления изобретения, MASP-3-ингибирующий агент, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий пептид ингибируют MASP-3-опосредованное созревание фактора D. В другом варианте осуществления изобретения MASP-3-ингибирующий агент ингибирует MASP-3-опосредованную активацию фактора В. MASP-3-ингибирующие агенты, используемые в способе согласно изобретению, могут снижать MASP-3-зависимую активацию комплемента более чем на 10%, например более чем на 20%, более чем на 50% или более чем на 90%. В одном варианте осуществления изобретения MASP-3-ингибирующий агент снижает MASP-3-зависимую активацию комплемента более чем на 90% (т.е. в результате, MASP-3-зависимая активация комплемента составляет только 10% или менее). Предполагается, что ингибирование MASP-3 будет блокировать, полностью или частично, LEA-1-ассоциированный лизис и опсонизацию и лектин-независимое превращение фактора В и фактора D, ассоциированных с лизисом и опсонизацией.

В одном из вариантов осуществления изобретения высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело связывается с доменом сериновой протеазы MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2) с аффинностью менее, чем 500 пМ (например, менее чем 250 пМ, менее чем 100 пМ, менее чем 50 пМ или менее чем 10 пМ) и ингибирует альтернативный путь активации комплемента в крови млекопитающего по меньшей мере на 50% (например, по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% или более).

"Антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как полипептид, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания эпитопа, локализованного в вариабельной области (также называемого здесь доменом вариабельной области) молекулы иммуноглобулина.

Используемый здесь термин "антитело" охватывает антитела и фрагменты антител, происходящие от любого антитело-продуцирующего млекопитающего (например, мышей, крыс, кроликов и приматов, включая человека) или выделенные из гибридомы путем фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, или из трансгенных животных (или другими методами получения антител или фрагментов антител), где указанные антитела специфически связываются с полипептидом-мишенью, таким как, например, полипептиды MASP-1, MASP-2 или 3-MASP или их части. Это не означает, что термин "антитело" ограничивается источником его происхождения или способом его получения (например, путем выделения из гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, выделения из трансгенного животного, пептидного синтеза и т.п.).

Репрезентативными антителами являются поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; панспецифические, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела); гуманизированные антитела; мышинные антитела; химерные антитела, антитела

"мышь-человек", антитела "мышь-примат", моноклональные антитела "примат-человек"; и антиидиотипические антитела, и эти антитела могут представлять собой любое интактное антитело или его фрагмент. Используемый здесь термин "антитело" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты, такие как антитело с одной переменной областью (dAb) или другие известные фрагменты антител, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и т.п., одноцепочечные фрагменты (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, гибридные белки, включающие часть антитела вместе с антигенсвязывающим фрагментом с нужной специфичностью, гуманизированные антитела, химерные антитела, биспецифические антитела и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, содержащие антигенсвязывающий сайт или его фрагмент (эпитоп-распознающий сайт) с нужной специфичностью.

Термин "моноклональное антитело" означает популяцию гомогенных антител, где указанное моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), участвующих в селективном связывании эпитопа. Моноклональные антитела являются в высокой степени специфичными по отношению к антигену-мишени. Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их варианты, гибридные белки, включающие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любые другие модифицированные конфигурации молекул иммуноглобулина, содержащих антигенсвязывающий фрагмент (эпитоп-распознающий сайт) с нужной специфичностью и способностью связываться с эпитопом. Это не означает, что термин "антитело" ограничивается источником его происхождения или способом его получения (например, путем выделения из гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, выделения из трансгенного животного и т.п.). Этот термин включает целые иммуноглобулины, а также их фрагменты и т.п., описанные выше в определении термина "антитело".

Используемый здесь термин "фрагмент антитела" означает часть, происходящую от полноразмерного антитела или родственную ей часть, например, антитела против MASP 1, MASP-2 или MASP-3, которое обычно включает его антигенсвязывающую или переменную область. Иллюстративными примерами фрагментов антител являются Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; scFv-фрагменты; диантитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, биспецифические и мультиспецифические антитела, происходящие от фрагментов антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, включают набор гиперпеременных областей ("CDR") тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL), соответственно расположенных между набором каркасных областей (FR) тяжелой цепи и легкой цепи, которые обеспечивают сохранение CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR по отношению друг к другу. Используемый здесь термин "набор CDR" относится к трем гиперпеременным областям V-области тяжелой или легкой цепи. Эти области, если считать от N-конца тяжелой или легкой цепи, обозначены как "CDR1, CDR2" и "CDR3" соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт включает шесть CDR, представляющих собой набор CDR от каждой из V-областей тяжелой и легкой цепи.

Используемый здесь термин "набор FR" означает четыре фланкирующих аминокислотных последовательности, обрамляющих CDR, из набора CDR V-области тяжелой или легкой цепи. Некоторые остатки FR могут контактировать посредством связывания с антигеном, однако FR ответственны, главным образом, за укладку V-области в антигенсвязывающем сайте, а в частности, остатки FR являются непосредственно смежными с CDR. В FR, некоторые аминокислотные остатки и некоторые структурные особенности являются в очень высокой степени консервативными. В связи с этим, все последовательности V-области содержат внутреннюю дисульфидную петлю приблизительно из 90 аминокислотных остатков. Что касается укладки V-областей в связывающем сайте, то CDR, отображаются в виде выступающих мотивов петель, которые образуют антигенсвязывающую поверхность. По существу известны консервативные структурные области FR, которые влияют на форму укладки CDR-петель в некоторые "канонические" структуры, независимо от конкретного состава аминокислотной последовательности CDR.

Структуры и расположение переменных областей иммуноглобулина могут быть определены как описано в публикации Rabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, 1987, и в более поздних изданиях, имеющихся в настоящее время в Интернете (immuno.bme.nwu.edu).

Используемый здесь термин "одноцепочечный Fv" или "ScFv"-фрагмент антитела включает V_H- и V_L-домены антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv также включает полипептидный линкер между V_H- и V_L-доменами, что позволяет ScFv формировать нужную структуру для связывания с антигеном.

Используемый здесь термин "химерное антитело" означает рекомбинантный белок, который содержит переменные домены и гиперпеременные области, происходящие от животного, не являющегося человеком (например, грызуна), тогда как остальная молекула антитела происходит от человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерное антитело состоит из антигенсвязывающего фрагмента MASP-3-ингибирующего антитела, функционально присоединенного или присое-

диненного каким-либо другим образом к гетерологичной Fc-части другого антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный Fc-домен может происходить от Ig родительского антитела другого класса, включая IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM.

Используемый здесь термин "гуманизированное антитело" означает химерную молекулу, обычно получаемую рекомбинантными методами и имеющую антигенсвязывающий сайт, происходящий от иммуноглобулина животного, не являющегося человеком, где остальная структура молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности человеческого иммуноглобулина. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полноразмерные вариабельные области, присоединенные к константным доменам, либо только CDR, присоединенные к соответствующим каркасным областям в вариабельных доменах. Эпитоп-связывающие сайты могут представлять собой сайты дикого типа или могут быть модифицированы посредством одной или более аминокислотных замен. Другой подход ориентирован не только на получение человеческих константных областей, но также и на модификацию вариабельных областей и на их реконструкцию в целях получения формы, наиболее близкой к человеческой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышиное антитело содержит все шесть CDR, происходящие от мышиных антител). В других вариантах осуществления изобретения, гуманизированные антитела имеют одну или более CDR, (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые были модифицированы по сравнению с исходным антителом, и которые также называются здесь "одна или более CDR, происходящие от одной или более CDR исходного антитела".

Антитело "специфически связывается" с мишенью, если оно связывается с мишенью с большей аффинностью и/или авидностью, чем с другими веществами. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2). В одном варианте осуществления изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с одним или более эпитопами, описанными в табл. 4, в табл. 28 или показанными на фиг. 62.

Используемый здесь термин "маннан-связывающий лектин" ("MBL") эквивалентен термину "маннан-связывающий белок" ("MBP").

Используемый здесь термин "мембрано-атакующий комплекс" ("MAC") означает комплекс из пяти концевых компонентов комплемента (C5b, объединенного с C6, C7, C8 и C9), которые встраиваются в мембраны и разрушают эти мембраны (такой комплекс также обозначается C5b-9).

Используемый здесь термин "индивидуум" включает всех млекопитающих, которыми являются, но не ограничиваются ими, человек; приматы, не относящиеся к человеку; собаки, кошки, лошади, овцы, козы, коровы, кролики, свиньи и грызуны.

Используемые здесь аминокислотные остатки имеют нижеследующие сокращения, а именно: 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 более широком смысле, природные аминокислоты могут подразделяться на группы исходя из химических свойств боковых цепей соответствующих аминокислот. "Гидрофобными" аминокислотами являются Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. "Гидрофильными" аминокислотами являются Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эта группа аминокислот может быть также подразделена на подклассы. "Незаряженными гидрофильными" аминокислотами являются Ser, Thr, Asn или Gln. "Кислотными" аминокислотами являются Glu или Asp. "Основными" аминокислотами являются Lys, Arg или His.

Используемый здесь термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену одной аминокислоты другой аминокислотой, где эти аминокислоты входят в одну из нижеследующих 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 здесь термин "олигонуклеотид" означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметики. Этот термин также охватывает олигонуклеотидные основания, состоящие из встречающихся в природе нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных связей (остова), а также олигонуклеотиды, имеющие модификации, не встречающиеся в природе.

Используемый здесь термин "эпитоп" означает участок на белке (например, на человеческом белке MASP-3), который связан с антителом. "Перекрывающиеся эпитопы" включают по меньшей мере один общий аминокислотный остаток (например, два, три, четыре, пять или шесть остатков), включая линейные и нелинейные эпитопы.

Используемые здесь термины "полипептид", "пептид" и "белок" являются синонимами и означают любую цепь аминокислот, связанных пептидной связью, независимо от их длины или посттрансляционной модификации. Описанные здесь белки MASP-3 могут содержать или представлять собой белки ди-

кого типа или могут представлять собой варианты, которые имеют не более чем 50 (например, не более чем одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, или 50) консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены обычно включают замены в пределах следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческий белок MASP-3 может иметь аминокислотную последовательность, которая на 70% или более (например, на 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 последовательности человеческого белка MASP-3, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 смежных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный пептидный фрагмент человеческого белка MASP-3 имеет длину менее чем 500 (например, менее чем 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, чем 500 смежных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, относящихся к антителу, которое связывается с MASP-3, пептидные фрагменты являются антигенными и сохраняют по меньшей мере 10% (например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% или более) способности полноразмерного белка индуцировать антигенный ответ у млекопитающего (см. ниже раздел "Методы продуцирования антитела").

Процент идентичности (%) аминокислотных последовательностей определяют как процент аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотам в сравниваемой последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей.

Выравнивание, проводимое в целях определения процента идентичности последовательностей, может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены известными методами.

В репрезентативных вариантах осуществления изобретения, человеческий белок MASP-3 (SEQ ID NO: 2) кодируется последовательностью кДНК, представленной как SEQ ID NO: 1. Специалистам в данной области известно, что последовательность кДНК, показанная как SEQ ID NO: 1, представляет собой один аллель человеческого MASP-3 и что могут присутствовать аллельные варианты и варианты альтернативного сплайсинга. Аллельные варианты нуклеотидных последовательностей, представленные в SEQ ID NO: 1, включая варианты, содержащие молчащие мутации, и варианты, приводящие к модификациям аминокислотной последовательности, входят в объем настоящего изобретения. Аллельные варианты последовательности MASP-3 могут быть клонированы путем зондирования кДНК или геномных библиотек, взятых у различных индивидуумов в соответствии со стандартными процедурами, или могут быть идентифицированы путем поиска гомологии посредством сравнения (например, поиска с использованием программы BLAST) в базах данных, содержащих такую информацию.

Используемая здесь "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты (например, полинуклеотид), которая не интегрирована в геномную ДНК данного организма. Так, например, молекула ДНК, которая кодирует фактор роста, и которая была отделена от геномной ДНК клетки, представляет собой выделенную молекулу ДНК. Другим примером выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является химически синтезированная молекула нуклеиновой кислоты, которая не была интегрирована в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, выделенная из организма конкретного вида, имеет меньший размер, чем полноразмерная молекула ДНК хромосомы этого вида.

Используемая здесь "конструкция молекулы нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, либо одноцепочечную, либо двухцепочечную, которая была модифицирована человеком так, чтобы она содержала смежные сегменты нуклеиновой кислоты, объединенные в соответствующую структуру, не существующую в природе.

Используемый здесь "экспрессионный вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, включающую ген, который экспрессируется в клетке-хозяине. Обычно, экспрессионный вектор содержит промотор транскрипции, ген и терминатор транскрипции. Экспрессия гена обычно осуществляется под контролем промотора, и в этом случае говорят, что такой ген "функционально присоединен" к промотору. Аналогичным образом, регуляторный элемент и коровый промотор считаются функционально присоединенными друг к другу, если регуляторный элемент модулирует активность корового промотора.

В настоящем описании при использовании слов "приблизительно", если они употребляются с числами, обычно подразумевается, что эти числа входят в интервал значений, варьирующихся в пределах $\pm 10\%$, а предпочтительно $\pm 5\%$, а наиболее предпочтительно $\pm 2\%$ от указанного значения. Если указаны интервалы величин, то подразумевается, что в этот интервал входят и конечные значения, если это не оговорено особо и не следует из контекста описания.

Существительные в единственном числе могут относиться к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует обратное. Так, например, термин "эксципиент" включает множество таких эксципиентов и их эквивалентов, известных специалистам; под словом "агент" может подразумеваться один агент, а также два или более агентов; под словом "антитело" может подразумеваться множество таких антител, а под словосочетанием "каркасная область" может подразумеваться одна или более каркасных областей и их эквивалентов, известных специалистам, и т.п.

Каждый вариант в этом описании представляет собой вариант с соответствующими необходимыми изменениями (*mutatis mutandis*) по сравнению с каждым другим вариантом, если это точно не указано в настоящем описании. Следует отметить, что любой вариант, обсуждаемый в этом описании, может быть осуществлен с применением любых способов, наборов, реагентов или композиций согласно изобретению и наоборот. Кроме того, композиции согласно изобретению могут быть использованы для осуществления способов согласно изобретению.

II. Лектиновый путь: новое понимание.

i. Обзор: лектиновый путь был переопределен.

Как описано в настоящей заявке, авторами изобретения было сделано неожиданное открытие, что лектиновый путь комплемента имеет две эффекторных цепи активации комплемента, которые запускаются комплексами активации лектинового пути, образованными углевод-распознающими компонентами (MBL, CL-11 и фиколинами): i) эффекторную цепь, образованную сериновыми протеазами MASP-1 и MASP-3, ассоциированными с лектиновым путем, и называемую здесь "эффекторной цепью лектинового пути 1" или "LEA-1"; и (ii) эффекторную цепь активации, запускаемую MASP-2, и называемую здесь "эффекторной цепью лектинового пути 2" или "LEA-2". Обе эти цепи LEA-1 и LEA-2 может осуществлять лизис и/или опсонизацию.

Было также определено, что лектин-независимое превращение фактора В посредством MASP-3 и лектин-независимое превращение фактора D посредством HTRA-1, MASP-1 и MASP-3, которые могут происходить в присутствии Ca^{++} , часто приводят к превращению C3bB в C3bBbC3bBb и про-фактора D в фактор D. Следовательно, ингибирование MASP-3 может ингибировать LEA-1 и лектин-независимую активацию фактора В и/или фактора D, что может приводить к ингибированию лизиса и/или опсонизации.

На фиг. 1 проиллюстрировано такое новое понимание путей активации комплемента. Как показано на фиг. 1, LEA-1 запускается MASP-3, связанным с лектином, который может активировать зимоген фактора D с образованием его активной формы и/или расщеплять C3b- или C3b (H_2O)-связанный фактор В, что будет приводить к превращению комплекса C3bB-зимоген в его ферментативно активную форму C3bBbC3bBb. Активированный фактор D, образованный MASP-3, может также превращать комплексы C3b- или C3b (H_2O)-зимоген в их ферментативно активную форму. MASP-1 способен к быстрой самоактивации, тогда как MASP-3 не обладает такой способностью. Во многих случаях MASP-1 представляет собой активатор MASP-3.

Хотя во многих примерах лектины (т.е. MBL, CL-11 или фиколины) могут непосредственно активировать клеточные поверхности, однако, на фиг. 1 также в общих чертах показаны лектин-независимые функции MASP-3, MASP-1 и HTRA-1, направленные на активацию фактора В и/или созревание фактора D. Как и в случае лектин-ассоциированной формы MASP-3 в LEA-1, лектин-независимая форма MASP-3 способна опосредовать превращение C3bB или C3b(H_2O) в C3bBbC3bBb (см. также фиг. 29 и 30) и про-фактор D в фактор D (см. фиг. 32). MASP-1 (см. также фиг. 32) и белок HTRA-1, не ассоциированный с MASP, может также активировать фактор D (публикация Stanton et al., Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration, представленная специалистами Ассоциации по изучению органов зрения и глазных болезней 2011 на Конференции, проходившей 4 мая 2011 года) по механизму, не требующему лектинового компонента.

Таким образом, MASP-1 (действующий по LEA-1 и в лектин-независимой форме), MASP-3 (действующий по LEA-1 и в лектин-независимой форме), и HTRA-1 (только в лектин-независимой форме) способны либо непосредственно, либо опосредованно активироваться в одной или более точках цепи реакции "MASP-3 - фактор D фактор В". При этом, они генерируют C3bBbC3bBb, C3-конвертазу альтернативного пути и стимулируют продуцирование и осаждение C3b на микробных поверхностях. Осаждение

C3b играет критическую роль в опсонизации, мечении поверхности микробов для их уничтожения фагоцитами хозяев, таких как макрофаги. В качестве примера (фиг. 28А и 28В) можно указать, что MASP-3 играет критическую роль в опсонизации *S.aureus*. Осаждение C3b быстро происходит на *S.aureus* под действием человеческой сыворотки по MASP-3-зависимому механизму (фиг. 28а и 28b).

Однако LEA-1 и лектин-независимые функции MASP-3, MASP-1, или HTRA-1 не ограничиваются опсонизацией. Как схематически показано на диаграмме на фиг. 1, эти три компонента могут также вызывать лизис клеток в результате опосредованной или прямой активации фактора В и продуцирования C3b. Эти компоненты образуют комплексы, которые генерируют C5-конвертазу альтернативного пути, C3bBbC3bBb(C3b)_n. Как описано далее, необходимость MASP-3 и MBL, но не MASP-2 (и следовательно, не LEA-2 в этом примере), в лизисе *N.meningitidis*, (см. фиг. 11-13) подтверждает роль LEA-1 в лизисе. Таким образом, результаты опсонизации, полученные в исследованиях *S.aureus*, и результаты лизиса, полученные в исследованиях *N.meningitidis*, подтверждают роль LEA-1 в обоих процессах (как показано на диаграмме на фиг. 1). Кроме того, эти исследования продемонстрировали, что опсонизация и лизис могут быть результатом превращения C3bB или C3b(H₂O) и/или профактора D в фактор D, а поэтому эти процессы могут быть результатом лектин-независимой роли MASP-3, MASP-1 или HTRA-1. Таким образом, модель, разработанная авторами изобретения и показанная на фиг. 1, подтверждает возможность применения ингибиторов, главным образом, MASP-3, но и MASP-1 и/или HTRA-1, для блокирования опсонизации и/или лизиса и для лечения патологий, вызываемых нарушением регуляции этих процессов.

1. Эффекторная цепь лектинового пути (LEA-1).

Первая эффекторная цепь лектинового пути, LEA-1, образована сериновыми протеазами MASP-1 и MASP-3, ассоциированными с лектиновым путем. Как описано в настоящей заявке, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что в отсутствие MASP-3 и в присутствии MASP-1, альтернативный путь эффективно не активируется на поверхностных структурах. Эти результаты показали, что MASP-3 играет ранее не известную роль в инициации альтернативного пути, и это подтверждается с использованием MASP-3-дефицитной сыворотки ЗМС, взятой у пациентов с редким ЗМС-аутосомно-рецессивным расстройством (Rooryck C. et al., Nat. Genet. 43 (3):197-203 (2011)) с мутациями, которые делают домен сериновой протеазы MASP-3 нефункциональным. На основании этих новых результатов было высказано предположение, что активация комплемента по альтернативному пути, определенному ранее, является MASP-3-зависимой. Действительно, MASP-3 и его активация LEA-1 могут также рассматриваться как сомнительные инициаторы альтернативного пути.

Как описано далее в примерах 1-4, авторами настоящего изобретения наблюдалась более высокая активность лектин-зависимой активации альтернативного пути в MASP-2-дефицитной сыворотке, что приводило к повышению бактерицидной активности (т.е. литической активности), направленной против *N.meningitidis*. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что в отсутствие MASP-2, MASP-1-несущие углевод-распознающие комплексы с большей вероятностью будут тесно связаны с MASP-1-несущими углевод-распознающими комплексами и будут активировать MASP-3. Известно, что во многих случаях, активация MASP-3 зависит от активности MASP-1, поскольку MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом, а поэтому для превращения его зимогенной формы в ферментативно активную форму, ему в большинстве случаев требуется активность MASP-1. MASP-1 (как и MASP-2) является аутоактивирующим ферментом, в то время как MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом и, во многих случаях, для превращения его зимогенной формы в ферментативно активную форму, ему требуется ферментативная активность MASP-1. См. Zundel S. et al., J. Immunol., 172 (7):4342-50 (2004). В отсутствие MASP-2, все комплексы, распознающие лектиновый путь, нагружены либо MASP-1, либо MASP-3. Таким образом, отсутствие MASP-2 облегчает MASP-1-опосредованное превращение MASP-3 в его ферментативно активную форму. После активации MASP-3, активированный MASP-3 инициирует активацию альтернативного пути, который теперь называется активацией "LEA-1", посредством MASP-3-опосредованного превращения C3bB в C3bBbC3bBb и/или превращения профактора D в фактор D. C3bBb, также называемый здесь C3-конвертазой альтернативного пути, расщепляет дополнительные молекулы C3 с последующим осаждением опсонинных молекул C3b. Если несколько фрагментов C3b тесно связываются с C3bBbC3bBb-конвертазным комплексом, то это приводит к образованию C5-конвертазы альтернативного пути C3bBbC3bBb(C3b)_n, что способствует образованию МАС. Кроме того, молекулы C3b, осажденные на поверхности, образуют новые участки для связывания с фактором В, которые уже могут расщепляться фактором D и/или MASP-3 с образованием дополнительных участков, в которых могут образовываться C3- и C5-конвертазные комплексы альтернативного пути. Этот последний процесс необходим для эффективного лизиса и не требует присутствия лектинов после инициации осаждения C3b. В недавней публикации (Iwaki D. et al., J. Immunol. 187(7):3751-8 (2011)), а также на основании данных, полученных авторами настоящего изобретения (фиг. 30), было показано, что комплекс "C3-конвертаза - зимоген C3bB альтернативного пути" превращается в свою ферментативно активную форму посредством активированного MASP-3. Авторами изобретения было обнаружено, что MASP-3-опосредованное расщепление фактора В представляет собой субкомпонент недавно описанного LEA-1, что стимулирует лектин-зависимое образование C3-конвертазы C3bBbC3bBb альтернативного пути.

2. Эффекторная цепь лектинового пути (LEA-2).

Вторая эффекторная цепь лектинового пути, LEA-2, образована сериновой протеазой MASP-2, ассоциированной с лектиновым путем. MASP-2 активируется после связывания компонентов распознавания их соответствующего паттерна, а также может активироваться под действием MASP-1, что впоследствии приводит к расщеплению компонента C4 комплемента с образованием C4a и C4b. После связывания продукта расщепления C4b с C2 плазмы, C4b, связанный с C2, становится субстратом второй MASP-2-опосредованной стадии расщепления, которая превращает C2, связанный с C4b, в ферментативно активный комплекс C4bC2a и небольшой фрагмент расщепления C2b. C4b2a представляет собой C3-конвертирующую C3-конвертазу лектинового пути, способствующую превращению избыточного компонента C3 плазмы в C3a и C3b. C3b тесно связывается с любой поверхностью посредством тиюэфирной связи. Если несколько фрагментов C3b тесно связываются с C3-конвертазным комплексом C4b2a, то эта конвертаза изменяет свою специфичность для превращения C5 в C5b и C5a с образованием C3-конвертазного комплекса C4b2a(C3b)_n. Хотя эта C5-конвертаза может инициировать образование MAC, однако, предполагается, что такой процесс является недостаточно эффективными для стимуляции своего собственного лизиса. Скорее всего, исходные опсоны C3b, продуцируемые LEA-2, образуют ядро для формирования C3-конвертазы нового альтернативного пути и C5-конвертазных сайтов, которые, в конечном счете, будут приводить к избыточному образованию MAC и лизису. Это последнее событие опосредуется активацией фактора В в фактор D, ассоциированной с C3b, образуемого LEA-2, и, следовательно, зависит от LEA-1 благодаря важной роли MASP-1 в созревании фактора D. Существует также MASP-2-зависимый C4-обходной путь активации, позволяющий активировать C3 в отсутствие C4, и этот путь играет важную роль в патофизиологии ишемического-реперфузионного повреждения, поскольку C4-дефицитные мыши не защищены от ишемического-реперфузионного повреждения, а MASP-2-дефицитные мыши обладают такой защитой (Schwaebler et al., PNAS, 2011, см. выше). LEA-2 также ассоциируется с путем свертывания крови, включая расщепление протромбина с образованием тромбина (общий путь), а также расщепление фактора XII (фактора Хагемана) с его превращением в ферментативно активную форму XIIa. Фактор XIIa, в свою очередь, расщепляет фактор XI с образованием XIa (внутренний путь). Активация внутреннего пути каскада реакций свертывания крови приводит к образованию фибрина, что имеет решающее значение для формирования тромба.

На фиг. 1 проиллюстрировано новое понимание лектинового пути и альтернативного пути на основе результатов, приведенных в настоящем описании. На фиг. 1 показана роль LEA-2 в опсонизации и лизисе. Помимо того, что MASP-2 является инициатором "последующего" осаждения C3b (и в конечном счете, опсонизации) в нескольких лектин-зависимых физиологических процессах (фиг. 18A, 18B, 18C), он также играет определенную роль в лизисе чувствительных к сыворотке бактерий. Как показано на фиг. 1, предлагаемый молекулярный механизм, ответственный за повышенную бактерицидную активность MASP-2-дефицитной или MASP-2-обедненной сыворотки/плазмы в отношении чувствительных к сыворотке патогенов, таких как *N.meningitidis*, заключается в том, что для лизиса бактерий, комплексы распознавания лектинового пути, ассоциированные с MASP-1 и MASP-3, должны тесно связываться друг с другом на бактериальной поверхности, что позволит MASP-1 расщеплять MASP-3. В отличие от MASP-1 и MASP-2, MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом, но во многих случаях для его превращения в ферментативно активную форму ему требуется активация/расщепление под действием MASP-1.

Как дополнительно показано на фиг. 1, активированный MASP-3 может затем расщеплять связанный с C3b фактор В на поверхности патогена с инициацией альтернативного каскада реакций активации благодаря образованию ферментативно активных C3- и C5-конвертаз альтернативного пути C3bBbC3bBb и C3bBb(C3b)_n соответственно. MASP-2-несущие комплексы активации лектинового пути не участвуют в активации MASP-3 и, в отсутствие MASP-2 или после истощения MASP-2, все комплексы активации лектинового пути будут нагружены либо MASP-1, либо MASP-3. Таким образом, в отсутствие MASP-2, значительно увеличивается вероятность того, что на микробной поверхности, MASP-1- и MASP-3-несущие комплексы активации лектинового пути будут располагаться в непосредственной близости друг к другу, что будет приводить к большей активации MASP-3, и, тем самым, к повышению скорости MASP-3-опосредованного расщепления фактора В, связанного с C3b, с образованием C3- и C5-конвертаз альтернативного пути C3bBbC3bBb и C3bBb(C3b)_n на микробной поверхности. Это приводит к активации терминальных каскадов активации C5b-C9, которые образуют мембрано-атакующий комплекс, состоящий из поверхностно-связанного C5b, ассоциированного с C6; C5bC6, ассоциированного с C7; C5bC6C7, ассоциированного с C8; и C5bC6C7C8, что будет приводить к полимеризации C9, который встраивается в структуру бактериальной поверхности и образует поры в стенках бактерий, что будет вызывать осмотический лизис бактерий, являющейся мишенью для этого компонента.

Сущность этой новой концепции заключается в том, что представленные здесь данные со всей очевидностью показали, что комплексы активации лектинового пути запускают два последующих различных пути активации, как показано на фиг. 1:

i) LEA-1: MASP-3-зависимый путь активации, который инициирует и запускает активацию компонента посредством генерации конвертазы альтернативного пути C3bBbC3bBb благодаря первоначально-

му расщеплению и активации фактора В на поверхностях активаторов, которые затем будут катализировать осаждение C3b и образование конвертазы альтернативного пути C3bBbC3bBb. MASP-3-индуцируемый путь активации играет важную роль в опсонизации и лизисе микробов и запускает альтернативный путь на поверхности бактерий, что приводит к оптимальному уровню активации для генерации мембрано-атакующих комплексов; и

ii) LEA-2: MASP-2-зависимый путь активации, приводящий к образованию C3-конвертазы лектинового пути C4b2a и, после аккумуляции продукта расщепления C3, т.е. C3b, к образованию C5-конвертазы C3bBbC3bBb(C3b)_n. В отсутствие комплемента C4, MASP-2 может образовывать альтернативный C3-конвертазный комплекс, который включает C2 и фактор свертывания крови XI.

MASP-3-индуцируемый путь активации, помимо его определенной роли в лизисе, играет важную роль в опсонизации бактерий, в результате чего микробы покрываются ковалентно связанным C3b и продуктами его расщепления (т.е. iC3b и C3dg), которые будут служить мишенью для поглощения и лизиса под действием фагоцитов, несущих рецептор C3, таких как гранулоциты, макрофаги, моноциты, микроглиальные клетки и ретикулоэндотелиальная система. Этот путь является наиболее эффективным путем клиренса бактерий и микроорганизмов, которые резистентны к лизису комплемента. К таким бактериям относится большинство грамположительных бактерий.

Помимо LEA-1 и LEA-2, существует и другой возможный путь лектин-независимой активации фактора D посредством MASP-3, MASP-1 и/или HTRA-1, а также возможный путь лектин-независимой активации фактора В под действием MASP-3.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь полагают, что каждый из (i) LEA-1, (ii) LEA-2 и (iii) лектин-независимой активации фактора В и/или фактора D приводит к опсонизации и/или образованию MAC с последующим лизисом.

ii. Общее описание MASP-1, MASP-2 и MASP-3.

II. Общее описание MASP-1, MASP-2 и MASP-3.

В настоящее время известно, что три маннан-связывающие и ассоциированные с лектином протеазы (MASP-1, MASP-2 и MASP-3) связываются в человеческой сыворотке с маннан-связывающим лектином (MBL). В современной литературе маннан-связывающий лектин также называется "белком, связывающимся с маннозой" или "лектином, связывающимся с маннозой". Комплекс MBL-MASP играет важную роль в сохранении врожденного иммунитета благодаря связыванию MBL с углеводными структурами, присутствующими на микроорганизмах широкого ряда. Взаимодействие MBL со специфическими массивами углеводных структур приводит к активации проферментов MASP, которые, в свою очередь, активируют комплемент посредством расщепления компонентов C4 и C2 комплемента с образованием C3-конвертазы C4b2b (Kawasaki et al., J. Biochem 106:483-489 (1989); Matsushita & Fujita, J. Exp. Med. 176:1497-1502 (1992); Ji et al., J. Immunol. 150:571-578 (1993)).

До недавнего времени считалось, что проферментный комплекс MBL-MASP содержит только протеазу одного типа (MASP-1), но теперь стало ясно, что существуют две другие различные протеазы (т.е. MASP-2 и MASP-3), связанные с MBL (Thiel et al. Nature 386: 506-510 (1997); Dahl et al. Immunity 15: 127-135 (2001)), а также дополнительный сывороточный белок 19 кДа, обозначаемый "MAp19" или "sMAP" (Stover et al., J. Immunol 162:3481-3490 (1999); Stover et al., J. Immunol. 163:6848-6859 (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-63 (1999)).

MAp19 представляет собой генный продукт альтернативного сплайсинга структурного гена MASP-2 и не имеет четырех С-концевых доменов MASP-2, в том числе домена серин-эндопептидазы. Сверхэкспрессированный усеченный мРНК-транскрипт, кодирующий MAp19, образуется в результате события альтернативного сплайсинга/полиаденилирования гена MASP-2. По аналогичному механизму ген MASP-1/3 экспрессирует три основных генных продукта, а именно, две сериновые протеазы MASP-1 и MASP-3 и усеченный генный продукт размером 44 кДа, обозначаемый "MAp44" (Degen et al., J. Immunol. 183 (11):7371-8 (2009); Skjoedt et al., J. Biol. Chem. 285:8234-43 (2010)).

MASP-1 был впервые описан как компонент протеазы P-100 сывороточного Ра-реактивного фактора, который в настоящее время известен как комплекс, состоящий из MBL+MASPs (Matsushita et al., Collectins and Innate Immunity, (1996); Ji et al., J. Immunol. 150:571-578 (1993)). Способность MBL-ассоциированной эндопептидазы в комплексе MBL-MASP действовать на компоненты C4 и C2 комплемента, по существу, идентична такой способности фермента C1s в комплексе C1q-(C1r)₂-(C1s)₂ классического пути комплемента, что позволяет предположить, что существует комплекс MBL-MASPs, который функционально аналогичен комплексу C1q-(C1r)₂-(C1s)₂. Комплекс C1q-(C1r)₂-(C1s)₂ активируется при взаимодействии C1q с Fc-областями антитела IgG или IgM, присутствующими в иммунных комплексах. Это приводит к аутоактивации профермента C1r, который, в свою очередь, активирует профермент C1s, который впоследствии действует на компоненты C4 и C2 комплемента.

Стехиометрия комплекса MBL-MASPs отличается от стехиометрии комплекса C1q-(C1r)₂-(C1s)₂ тем, что различные олигомеры MBL, по всей видимости, ассоциируются с различными соотношениями MASP-1/MAp19 или MASP-2/MASP-3 (Dahl et al., Immunity 15:127-135 (2001)). Большинство MASPs и MAp19, обнаруженных в сыворотке, не образуют комплексы с MBL (Thiel et al., J. Immunol. 165:878-887 (2000)) и могут частично ассоциироваться с фиколинами, т.е. недавно описанной группой лектинов,

имеющих фибриноген-подобный домен, способный связываться с N-ацетилглюкозаминовыми остатками на микробных поверхностях (Le et al., FEBS Lett 425:367 (1998); Sugimoto et al., J. Biol. Chem. 273:20721 (1998)). Среди них человеческие L-фиколин, H-фиколин и M-фиколин ассоциируются с MASPS, а также с MAP19 и могут активировать лектиновый путь после связывания со специфическими углеводными структурами, распознаваемыми фиколинами (Matsushita et al., J. Immunol. 164:2281-2284 (2000); Matsushita et al., J. Immunol. 168:3502-3506 (2002)). Помимо фиколинов и MBL, MBL-подобный лектин коллектин, называемый CL-11, был идентифицирован как молекула распознавания лектинового пути (Hansen et al. J. Immunol. 185:6096-6104 (2010); Schwaebler et al. PNAS 108:7523-7528 (2011)). Существуют убедительные доказательства наличия физиологической важности этих альтернативных молекул распознавания углеводов, а поэтому важно понимать, что MBL не единственный компонент, распознающий лектиновый путь активации, и что дефицит MBL нельзя ошибочно принимать за дефицит лектинового пути. Возможность существования массива альтернативных углевод-распознающих комплексов, структурно родственных MBL, может расширить спектр микробных структур, которые инициируют прямой ответ врожденной иммунной системы посредством активации комплемента.

Все молекулы распознавания лектинового пути характеризуются специфическим MASP-связывающим мотивом в пределах области их стебля, гомологичной коллагену (Wallis et al. J. Biol. Chem. 279:14065-14073 (2004)). Сайт связывания с MASP в MBL, CL-11 и фиколинах характеризуется конкретным мотивом в этом домене: Нур-Gly-Lys-Хаа-Gly-Pro, где Нур представляет собой гидроксипролин, а Хаа обычно представляет собой алифатический остаток. Точковые мутации в этой последовательности нарушают связывание с MASP.

1. Соответствующие структуры, последовательности, хромосомные локализации и варианты сплайсинга MASP-1 и MASP-3.

На фиг. 2 схематически представлена диаграмма, иллюстрирующая структуру домена человеческого полипептида MASP-1 (SEQ ID NO: 8), человеческого полипептида MASP-3 (SEQ ID NO: 2) и человеческого полипептида MAP44, и экзонов, кодирующих эти полипептиды. Как показано на фиг. 2, сериновые протеазы MASP-1 и MASP-3 состоят из шести различных доменов, расположенных, как было обнаружено, в C1r и C1s; т.е. (I) N-концевой домен C1r/C1s/VEGF морского ежа/белка морфогенеза кости (или CUBI); (II) домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF); (III) второй домен CUB (CUBII); (IV и V) два домена белка регуляции комплемента (CCP1 и CCP2); и (VI) домен сериновой протеазы (SP).

Кодируемые кДНК аминокислотные последовательности человеческого и мышинного MASP-1 (Sato et al., Int. Immunol. 6:665-669 (1994); Takada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1003-1009 (1993); Takayama et al., J. Immunol. 152:2308-2316 (1994)), человеческого, мышинного и крысиного MASP-2 (Thiel et al., Nature 386:506-510 (1997); Endo et al., J. Immunol. 161:4924-30 (1998); Stover et al., J. Immunol. 162:3481-3490 (1999); Stover et al., J. Immunol. 163:6848-6859 (1999)), а также человеческого MASP-3 (Dahl et al., Immunity 15:127-135 (2001)) указывают на то, что эти протеазы представляют собой сериновые пептидазы, имеющие характерную триаду остатков His, Asp и Ser в их предполагаемых каталитических доменах (регистрационные номера Genbank: человеческий MASP-1: BAA04477.1 (SEQ ID NO: 8); мышинный MASP-1: BAA03944; крысиный MASP-1: AJ457084; человеческий MASP-3: AAK84071 (SEQ ID NO: 2); мышинный MASP-3: AB049755, доступные в Genbank с 15 февраля, 2012 (SEQ ID NO: 3); крысиный MASP-3 (SEQ ID NO: 4); куриный MASP-3 (SEQ ID NO: 5); кроличий MASP-3 (SEQ ID NO: 6), и MASP-3 собакоподобных обезьян (SEQ ID NO: 7)).

Кроме того, как показано на фиг. 2, после превращения зимогена в активную форму тяжелая цепь (альфа или А-цепь) и легкая цепь (бета, или В-цепь) были расщеплены с образованием А-цепи, связанной дисульфидными связями, и меньшей В-цепи, представляющей собой домен сериновой протеазы. Одноцепочечный профермент MASP-1 активируется (подобно проферменту C1r и C1s) посредством расщепления связи Arg-Ile, расположенной между вторым доменом CCP (доменом V) и доменом сериновой протеазы (доменом VI). Считается, что проферменты MASP-2 и MASP-3 активируется таким же образом, как и MASP-1. Каждый белок MASP образует гомодимеры и отдельно ассоциируется с MBL и фиколинами Ca^{++} -зависимым образом.

Человеческий полипептид MASP-1 (SEQ ID NO: 8) и полипептид MASP-3 (SEQ ID NO: 2) происходит от одного структурного гена (Dahl et al., Immunity 15:127-135 (2001)), который был картирован по области 3q27-28 длинного плеча хромосомы 3 (Takada et al., Genomics 25:757-759 (1995)). Транскрипты мРНК MASP-3 и MASP-1, генерируются из первичного транскрипта посредством альтернативного сплайсинга/полиаденилирования. Продукт трансляции MASP-3 состоит из альфа-цепи, которая является общей для MASP-1 и MASP-3, и бета-цепи (домена сериновой протеазы), которая является уникальной для MASP-3. Как показано на фиг. 2, человеческий ген MASP-1 включает 18 экзонов. кДНК человеческого MASP-1 кодируется экзонами 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 и 18. Как дополнительно показано на фиг. 2, человеческий ген MASP 3 включает двенадцать экзонов. кДНК человеческого MASP-3 (представленная как SEQ ID NO: 1) кодируется экзонами 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 и 12. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию белка, называемого MBL-ассоциированным белком 44 "(MAP44)", происходящим от экзонов 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

Человеческий полипептид MASP-1 (SEQ ID NO: 8, Genbank BAA04477.1) имеет 699 аминокислотных остатков, которые включают лидерный пептид из 19 остатков. Если лидерный пептид отсутствует, то вычисленная молекулярная масса MASP-1 составляет 76976 Да. Как показано на фиг. 2, аминокислотная последовательность MASP-1 содержит четыре N-связанных сайта гликозилирования. Домены человеческого белка MASP-1 (см. SEQ ID NO: 8) показаны на фиг. 2 и включают N-концевой домен C1r/C1s/VEGF морского ежа/белка морфогенеза кости (CUBI) (а.к. 25-137 в SEQ ID NO: 8); домен, подобный эпидермальному фактору роста (а.к. 139-181 в SEQ ID NO: 8); второй домен CUB (CUBII) (а.к. 185-296 в SEQ ID NO: 8), а также тандем доменов белка регуляции комплемента (CCP1, а.к. 301-363 и CCP2, а.к. 367-432 в SEQ ID NO: 8), и домен сериновой протеазы (а.к. 449-694 в SEQ ID NO: 8).

Человеческий полипептид MASP-3 (SEQ ID NO: 2, Genbank AAK84071) имеет 728 аминокислотных остатков (как показано на фиг. 3), которые включают лидерный пептид из 19 остатков (показано подчеркнутыми аминокислотными остатками на фиг. 3).

Если лидерные пептиды отсутствуют, то вычисленная молекулярная масса MASP-3 составляет 81873 Да. Как показано на фиг. 2, в MASP-3 присутствует семь N-связанных сайтов гликозилирования. Домены человеческого белка MASP-3 (см. SEQ ID NO: 2) показаны на фиг. 2 и включают N-концевой домен C1r/C1s/VEGF морского ежа/белка морфогенеза кости (CUBI) (а.к. 25-137 в SEQ ID NO: 2), домен, подобный эпидермальному фактору роста (а.к. 139-181 в SEQ ID NO: 2); второй домен CUB (CUBII) (а.к. 185-296 в SEQ ID NO: 2), а также тандем доменов белка регуляции комплемента (CCP1, а.к. 299-363 и CCP2, а.к. 367-432 в SEQ ID NO: 2), и домен сериновой протеазы (а.к. 450-728 в SEQ ID NO: 2).

Продукт трансляции MASP-3 состоит из альфа-цепи (тяжелой цепи), содержащий домены CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2 (альфа-цепь: а.к. 1-448 в SEQ ID NO: 2), которые являются общими для MASP-1 и MASP-3, и легкой цепи (бета-цепи: а.к. 449-728 в SEQ ID NO: 2), содержащей домен сериновой протеазы, который является уникальным для MASP-3.

2. Сравнение аминокислотных последовательностей MASP-3 различных видов.

На фиг. 4 проиллюстрировано выравнивание MASP-3 для нескольких видов, где показано сравнение полноразмерного человеческого белка MASP-3 (SEQ ID NO: 2), белка собакоподобных обезьян (SEQ ID NO: 7), крысиного белка (SEQ ID NO: 4), мышинного белка (SEQ ID NO: 3), куриного белка (SEQ ID NO: 5) и кроличьего белка (SEQ ID NO: 6). На фиг. 5 проиллюстрировано выравнивание последовательностей доменов сериновой протеазы нескольких видов (SP), т.е. человеческих (а.к. 450-728 в SEQ ID NO: 2); кроличьих (а.к. 450-728 в SEQ ID NO: 6); мышинных (а.к. 455-733 в SEQ ID NO: 3); крысиных (а.к. 455-733 в SEQ ID NO: 4) и куриных (а.к. 448-730 в SEQ ID NO: 5).

Как показано на фиг. 4, среди различных видов существует высокий уровень консервативности аминокислотных последовательностей полипептида MASP-3, а в частности, в домене SP (фиг. 5). Как дополнительно показано на фиг. 5, каталитическая триада (H в остатке 497, D в остатке 553 и S в остатке 664 в полноразмерном человеческом MASP-3 (SEQ ID NO: 2) является консервативной у различных видов. В табл. 1 систематизирован процент идентичности доменов SP MASP-3 у различных видов.

Таблица 1. Процент идентичности доменов SP MASP-3 у различных видов

	Собакоподобная обезьяна	Кролик	Крыса	Мышь	Курица
Человек	95%	94%	92%	91%	79%
Собакоподобная обезьяна		94%	90%	90%	79%
Кролик			92%	92%	81%
Крыса				97%	78%
Мышь					78%

MASP-3 не обладает протеолитической активностью в отношении субстратов C4, C2 или C3. И наоборот, как первоначально сообщалось, MASP-3 действует как ингибитор лектинового пути (Dahl et al., Immunity 15:127-135 (2001)). Этот вывод может быть сделан потому, что в отличие от MASP-1 и MASP-2, MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом (Zundel S. et al., J. Immunol. 172:4342-4350 (2004); Megyeri et al., J. Biol. Chem. 288:8922-8934 (2013)).

В последнее время подтверждение возможных физиологических функций MASP-1 и MASP-3 было сделано исходя из исследований на трансгенных мышах, а именно на мышах с комбинированным дефицитом MASP-1 и MASP-3. В то время как мыши с MASP-1/3-нокаутом имеют функциональный лектиновый путь (Schwaebler et al., PNAS 108:7523-7528 (2011)), однако, они, очевидно, не обладают активностью в отношении альтернативного пути (Takahashi et al., JEM 207(1):29-37 (2010)). Отсутствие активности в отношении альтернативного пути, очевидно, обусловлено дефектом процессинга фактора D комплемента, который необходим для активности в отношении альтернативного пути. У мышей с MASP-1/3-нокаутом, полноразмерный фактор D циркулирует в виде протеолитически неактивной про-формы, тогда как в сыворотке нормальных мышей почти весь фактор D находится в активной форме. Биохимический анализ показал, что MASP-1 может превращать фактор D комплемента из его зимогенной формы в фер-

ментативно активную форму (фиг. 32; Takahashi et al., JEM 207(1):29-37 (2010)). MASP-3 также расщепляет зимоген про-фактора D и продуцирует активный фактор D *in vitro* (фиг. 32; Takahashi et al., JEM 207(1):29-37 (2010)). Фактор D присутствует в виде активного фермента в кровотоке нормальных индивидуумов, а MASP-1 и MASP-3, а также HTRA-1 могут быть ответственны за эту активацию. Кроме того, у мышей с комбинированным дефицитом MBL и фиколина еще продуцируются нормальные уровни фактора D и действует полностью функциональный альтернативный путь. Таким образом, в этих физиологических функциях MASP-1 и MASP-3 необязательно участвуют лектины, и, таким образом, они не связаны с лектиновым путем. Рекомбинантные мышинный и человеческий MASP-3 также, очевидно, расщепляют фактор В и поддерживают осаждение С3 на *S. aureus in vitro* (фиг. 29; Iwaki D. et al., J. Immunol. 187(7):3751-8 (2011)).

В результате недавних исследований пациентов с синдромом ЗМС (ранее называемым синдромом Карневала, Мингарелли, Мальпеха и Михаэлиса; OMIM # 257920) неожиданная была обнаружена физиологическая роль MASP-3. У этих пациентов наблюдались серьезные аномалии развития, включая расщелины неба, заячью губу, черепные пороки развития и умственную отсталость. Генетический анализ выявил, что ЗМС-пациенты были гомозиготными по дисфункциональному гену MASP-3 (Rooryck et al., Nat Genet. 43(3):197-203 (2011)). Было обнаружено, что другая группа ЗМС-пациентов была гомозиготной по мутации в гене MASP-1, что приводило к отсутствию функциональных белков MASP-1 и MASP-3. У еще одной группы ЗМС-пациентов отсутствовал функциональный ген CL-11 (Rooryck et al., Nat. Genet. 43 (3):197-203 (2011)). Таким образом, комплекс CL-11 и MASP-3, очевидно, играет определенную роль в процессе эмбрионального развития. Молекулярные механизмы этого пути развития пока не ясны. Однако маловероятно, что они опосредуются по обычному комплемент-индуцированному механизму, так как у индивидуумов с дефицитом общих компонентов С3 комплемента, этот синдром не развивается. Таким образом, до открытия, сделанного авторами настоящего изобретения и описанного в настоящей заявке, функциональная роль MASP-3 в лектин-зависимой активации комплемента была ранее не установлена.

Структуры каталитического фрагмента MASP-1 и MASP-2 были определены с помощью рентгеновской кристаллографии. Структурное сравнение протеазного домена MASP-1 с доменами других протеаз комплемента выявило причину его ослабленной специфичности к субстрату (Dobo et al., J. Immunol. 183:1207-1214 (2009)). Хотя доступность субстрат-связывающей бороздки MASP-2 ограничена поверхностными петлями (Harmat et al., J. Mol. Biol. 342:1533-1546 (2004)), однако, MASP-1 имеет открытый субстрат-связывающий карман, который напоминает трипсин, но не другие протеазы комплемента. Структура MASP-1, которая по своим свойствам напоминает тромбин, представляет собой необычно крупную петлю из 60 аминокислот (петлю В), которая может взаимодействовать с субстратами. Еще одной интересной особенностью структуры MASP-1 является наличие внутреннего солевого мостика между S1 Asp189 и Arg224. Подобный солевой мостик можно обнаружить в субстрат-связывающем кармане фактора D, который может регулировать его протеазную активность. C1s и MASP-2 имеют почти идентичные специфичности к субстрату. Удивительно, что некоторые из восьми поверхностных петель MASP-2, которые определяют специфичности к субстрату, имеют совершенно различные конформации по сравнению с C1s. Это означает, что два функционально родственных фермента взаимодействуют с одними и теми же субстратами различным образом. Структура зимогена MASP-2 имеет неактивный протеазный домен с разрушенной оксианионной полостью и субстрат-связывающим карманом (Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-33444 (2005)).

Удивительно то, что зимоген MASP-2 обладает значительной активностью в отношении субстрата крупного белка С4. Вероятно, что структура зимогена MASP-2 является достаточно гибкой, что позволяет осуществлять транзицию между неактивной и активной формами. Эта гибкость, которая находит отражение в структуре, может играть определенную роль в процессе аутоактивации.

Нозерн-блот-анализ показал, что печень является основным источником мРНК MASP-1 и MASP-2. С использованием 5'-специфического зонда кДНК для MASP-1 был получен основной транскрипт MASP-1 размером 4,8 т.п.о. и один небольшой транскрипт размером приблизительно 3,4 т.п.о., которые оба присутствуют в печени человека и мыши (Stover et al., Genes Immunity 4:374-84 (2003)). мРНК MASP-2 (2,6 т.п.о.) и мРНК MAP19 (1,0 т.п.о.) в избытке экспрессируются в ткани печени. MASP-3 экспрессируется в печени, а также во многих других тканях, включая нервные ткани (Lynch N.J. et al., J. Immunol. 174:4998-5006 (2005)).

Было обнаружено, что у пациента с инфекциями и хроническим воспалительным заболеванием в анамнезе имеется мутированная форма MASP-2, которая не образует активный комплекс MBL-MASP (Stengaard-Pedersen et al., N. Engl. J. Med. 349:554-560 (2003)). Некоторые исследователи установили, что дефицит MBL часто приводит к развитию инфекций у детей (Super et al., Lancet 2:1236-1239 (1989); Garred et al., Lancet 346:941-943 (1995) и к снижению резистентности к ВИЧ-инфекции (Nielsen et al., Clin. Exp. Immunol. 100:219-222 (1995); Garred et al., Mol. Immunol. 33 (suppl 1):8(1996)). Однако другие исследования не выявили какой-либо существенной корреляции между низкими уровнями MBL и повышенной частотой возникновения инфекций (Egli et al., PLoS One. 8(1):e51983 (2013); Ruskamp et al., J. Infect. Dis. 198(11):1707-13 (2008); Israels et al., Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 95(6):F452-61 (2010)). При этом

в литературе указывается, что дефицит или отсутствие утилизации MASP или то и другое может оказывать негативное влияние на способность индивидуума вырабатывать быструю независимую от антитела защиту от некоторых патогенов.

Подтверждение данных о новом понимании с указанием традиционных условий анализа, которые проводят в отсутствии Ca^{++} , и результатов, полученных с использованием более широкого физиологического набора условий, которые включают Ca^{++} .

В данном описании приводятся несколько независимых экспериментальных данных, которые со всей очевидностью подтверждают вывод о том, что лектиновый путь активации комплемента активирует комплемент по двум независимым эффекторным механизмам: i) LEA-2: MASP-2-индуцированный путь, который опосредует запускаемые комплементом опсонизацию, хемотаксис (Schwaebler et al., PNAS 108:7523-7528 (2011)) и лизис клеток, и ii) LEA-1: новый MASP-3-зависимый путь активации, который инициирует активацию комплемента посредством генерации конвертазы C3bBbC3bBb альтернативного пути после расщепления и активации фактора В на поверхностях активатора, которые затем катализируют осаждение C3b и образование конвертазы C3bBbC3bBb альтернативного пути, что может приводить к лизису клеток, а также к опсонизации микробов. Кроме того, как описано в настоящей заявке, отдельная лектин-независимая активация фактора В и/или фактора D под действием MASP-1, MASP-3 или HTRA-1 или комбинации любых этих трех ферментов, может также приводить к активации комплемента по альтернативному пути.

MASP-3-индуцированная активация альтернативного пути, зависящая от лектинового пути, очевидно, способствует хорошо известному расщеплению связанного с C3b фактора В, опосредуемому фактором D, в результате чего достигается оптимальная скорость активации комплемент-зависимого лизиса посредством терминального каскада реакции активации для лизиса бактериальных клеток посредством образования мембрано-атакующих комплексов C5b-9 (MAC) на клеточной поверхности (фиг. 12-13). Для такого скорость-ограниченного события, очевидно, требуется оптимальная координация, что обусловлено дефицитом в отсутствии функциональной активности MASP-3, а также в отсутствии функциональной активности фактора D. Как описано здесь в примерах 1-4, авторами настоящего изобретения была обнаружена эта MASP-3-зависимая функция лектинового пути при исследовании фенотипа дефицита MASP-2 и ингибирования MASP-2 на экспериментальных мышинных моделях инфекции *N.meningitidis*. У мышей с дефицитом гена-мишени MASP-2 и у мышей дикого типа, обработанных ингибиторами MASP-2 на основе антитела, наблюдалась высокая резистентность к экспериментальной инфекции *N.meningitidis* (см. фиг. 6-10). Когда инфекционная доза была скорректирована так, чтобы она давала приблизительно 60% смертности у однопометных мышей дикого типа, то у всех мышей с дефицитом MASP-2 или с недостатком MASP-2 наблюдалось отсутствие инфекции, и эти мыши выживали (см. фиг. 6 и фиг. 10). Такая чрезвычайно высокая степень резистентности нашла свое отражение в значительном увеличении сывороточной бактерицидной активности в сыворотке мышей с дефицитом MASP-2 или с недостатком MASP-2. Дальнейшие эксперименты показали, что эта бактерицидная активность зависела от бактериального лизиса, индуцированного альтернативным путем. Сыворотка мышей с дефицитом фактора В, фактора D или C3 не обладала бактерицидной активностью в отношении *N.meningitidis*, что указывает на то, что альтернативный путь имеет важное значение для индуцирования терминального каскада реакций активации. Неожиданным результатом было то, что в сыворотке мышей с дефицитом MBL-A и MBL-C (обе молекулы представляют собой молекулы распознавания лектинового пути, которые распознают *N.meningitidis*), а также в сыворотке мышей с дефицитом сериновых протеаз MASP-1 и MASP-3, ассоциированных с лектиновым путем, наблюдалась полная потеря бактериолитической активности в отношении *N.meningitidis* (фиг. 13). В недавней работе (Takahashi M. et al., JEM 207: 29-37 (2010)) и в представленной здесь работе (фиг. 32) показано, что MASP-1 может превращать зимогенную форму фактора D в его ферментативно активную форму и может частично объяснить потерю литической активности благодаря отсутствию ферментативно активного фактора D в этих сыворотках. Это не объясняет отсутствие бактерицидной активности у MBL-дефицитных мышей, поскольку у этих мышей присутствует нормальный ферментативно активный фактор D (Banda et al., Mol. Immunol. 49(1-2):281-9 (2011)). Примечательно то, что при тестировании человеческой сыворотки, взятой у ЗМС-пациентов с редким аутосомно-рецессивным расстройством (Rooryck C. et al., Nat. Genet. 43(3):197-203) с мутациями, которые сообщают домену сериновой протеазы MASP-3 дисфункциональность, не было обнаружено какой-либо бактерицидной активности по отношению к *N.meningitidis* (NB: эти сыворотки имеют MASP-1 и фактор D, но не MASP-3).

Предположение, что человеческой сыворотке, для вырабатывания бактерицидной активности, требуется MASP-3-зависимая активность, опосредованная лектиновым путем, было дополнительно подтверждено наблюдением того факта, что MBL-дефицитная человеческая сыворотка также не способна лизировать *N.meningitidis* (фиг. 11-12). MBL представляет собой единственную человеческую молекулу распознавания лектинового пути, которая связывается с этим патогеном. Так как MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом, то авторами настоящего изобретения была высказана гипотеза, что более высокая бактериолитическая активность в MASP-2-дефицитной сыворотке является следствием хорошей активации MASP-3 под действием MASP-1, поскольку в отсутствии MASP-2, все комплексы ак-

тивации лектинового пути, которые связываются с бактериальной поверхностью, будут нагружены либо MASP-1, либо MASP-3. Поскольку активированный MASP-3 расщепляет как фактор D (фиг. 32), так и фактор В с образованием их соответствующих ферментативно активных форм *in vitro* (фиг. 30. и Iwaki D. et al., J. Immunol. 187(7):3751-3758 (2011)), то наиболее вероятной функцией MASP-3 является стимуляция образования C3-конвертазы альтернативного пути (т.е. C3bBbC3bBb).

Хотя данные о лектин-зависимой роли являются убедительными, однако, многочисленные эксперименты показали, что MASP-3 и MASP-1 необязательно должны функционировать в комплексе с молекулами лектина. Эксперименты, например, проиллюстрированные на фиг. 28В, продемонстрировали способность MASP-3 активировать альтернативный путь (как показано по осаждению C3b на *S.aureus*) в условиях (т.е. в присутствии EGTA), в которых комплексы с лектином отсутствуют. На фиг. 28А показано, что осаждение в этих условиях зависит от фактора В, фактора D и фактора Р, каждый из которых является основным компонентом альтернативного пути. Кроме того, активация фактора D под действием MASP-3 и MASP-1 (фиг. 32) и активация фактора В под действием MASP-3 (фиг. 30) могут происходить *in vitro* в отсутствие лектина. И, наконец, исследования гемолиза мышинных эритроцитов в присутствии человеческой сыворотки продемонстрировали явную роль MBL и MASP-3 в лизисе клеток. Однако дефицит MBL не позволяет полностью воспроизвести тяжесть дефицита MASP-3, как это можно было бы ожидать, если бы все функциональные MASP-3 образовывали комплекс с MBL. Таким образом, авторы настоящего изобретения не хотят ограничиваться мнением, что все роли MASP-3 (и MASP-1), продемонстрированные в настоящей заявке, можно отнести исключительно к функции, ассоциированной с лектином.

Идентификация двух эффекторных цепей лектинового пути, а также возможных лектин-независимых функций MASP-1, MASP-3 и HTRA-1 представляет собой новые возможности для терапии в целях эффективного лечения определенных патологий человека, вызванных чрезмерной активацией комплемента в присутствии микробных патогенов или модифицированных клеток-хозяев или метаболических отложений. Как описано в настоящей заявке, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что в отсутствие MASP-3 и в присутствии MASP-1 альтернативный путь не активируется на поверхностных структурах (см. фиг. 15-16, 28В, 34-35А,В, 38-39). Поскольку альтернативный путь играет важную роль в запуске скорость-ограничивающих событий, приводящих к бактериальному лизису, а также к лизису клеток (Mathieson P.W. et al., J. Exp. Med. 177(6):1827-3(1993)), то полученные авторами результаты показали, что активированный MASP-3 играет важную роль в литической активности комплемента. Как показано на фиг. 12-13, 19-21, 36-37 и 39-40, в сыворотке ЗМС-пациентов, у которых отсутствует MASP-3, но не MASP-1, литический терминальный каскад реакций активации комплемента является дефектным. Данные, представленные на фиг. 12 и 13, продемонстрировали потерю бактериолитической активности в отсутствие функциональной активности MASP-3 и/или MASP-1/MASP-3. Кроме того, потеря гемолитической активности в MASP-3-дефицитной человеческой сыворотке (фиг. 19-21, 36-37 и 39-40) в сочетании с возможностью воссоздать гемолиз путем добавления рекомбинантных MASP-3 (фиг. 39-40) убедительно подтверждает вывод о том, что активация альтернативного пути на поверхностях-мишенях (что очень важно для запуска комплемент-опосредованного лизиса) зависит от присутствия активированного MASP-3. На основе нового понимания лектинового пути, подробно описанного выше, активация альтернативного пути на поверхностях-мишенях зависит от LEA-1 и/или от лектин-независимой активации фактора В и/или фактора D, которая также опосредуется MASP-3, и следовательно, агенты, которые блокируют MASP-3-зависимую активацию комплемента, будут предотвращать активацию альтернативного пути на поверхностях-мишенях.

Раскрытие существенной роли MASP-3-зависимой инициации активации альтернативного пути указывает на то, что альтернативный путь не является независимым автономным путем активации комплемента, как описано практически во всех известных медицинских руководствах и недавних обзорных статьях о комплементе. Современное и разделяемое многими учеными мнение состоит в том, что альтернативный путь активируется на поверхности некоторых частиц-мишеней (микробов, зимозана и кроличьих эритроцитов) посредством амплификации спонтанной активации C3 "по типу холостого хода". Однако, отсутствие какой-либо активации альтернативного пути в сыворотке мышей с дефицитом MASP-1 и 3-MASP и в человеческой сыворотке ЗМС-пациента на покрытых зимозаном планшетах и у двух различных бактерий (*N.meningitidis* и *S.aureus*), а также снижение гемолиза эритроцитов в MASP-3-дефицитных сыворотках человека и мыши показало, что для инициации активации альтернативного пути на этих поверхностях требуется функциональный MASP-3. Такая необходимая роль MASP-3 может быть либо лектин-зависимой, либо лектин-независимой и приводит к образованию комплексов C3-конвертазы и C5-конвертазы альтернативного пути, т.е. C3bBbC3bBb и C3bBbC3bBb(C3b)_n соответственно. Таким образом, авторы настоящего изобретения раскрыли информацию о существовании ранее трудных для понимания механизмов инициации альтернативного пути. Этот механизм инициации зависит от (i) LEA-1, т.е. недавно обнаруженной цепи активации лектинового пути, и/или (ii) лектин-независимой роли белков MASP-3, MASP-1 и HTRA-1.

3. Использование MASP-3-ингибирующих агентов для лечения заболеваний и состояний, ассоциированных с альтернативным путем.

Как описано в настоящей заявке, было показано, что высокоаффинные MASP-3-ингибирующие ан-

титела (например, с аффинностью связывания менее чем 500 пМ) полностью ингибируют альтернативный путь у млекопитающих, таких как грызуны, и у животных, не являющихся приматами, в молярных концентрациях ниже, чем концентрация MASP-3-мишени (например, в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень:mAb) (см. примеры 11-21). Как описано в примере 11, введение мышам высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела, mAb 13B1, приводит к почти полному удалению системной активности комплемента альтернативного пути по меньшей мере за 14 дней. Как более подробно описано в примере 12, в исследовании, проведенном на хорошо известной животной модели, ассоциированной с ПНГ, было показано, что mAb 13B1 значительно повышало жизнеспособность эритроцитов при ПНГ и защищенных эритроцитов при ПНГ по сравнению с их жизнеспособностью при ингибировании C5. Кроме того, как описано в примере 13, было показано, что mAb 13B1 снижало частоту и тяжесть заболевания у мышинной модели артрита. Результаты, представленные в этом примере, показали, что репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb 13B1, 10D12 и 4D5 являются весьма эффективными при блокировании альтернативного пути у приматов. Введение одной дозы mAb 13B1, 10D12 или 4D5 собакоподобным обезьянам приводило к устойчивой элиминации системной активности альтернативного пути в течение приблизительно 16 дней. Степень элиминации альтернативного пути у собакоподобных обезьян, обработанных высокоаффинными MASP-3-ингибирующими антителами, была сравнима со степенью, достигаемой при блокировании фактора D *in vitro* и *in vivo*, что указывает на то, что полная блокада превращения фактора D достигается под действием MASP-3-ингибирующих антител. Таким образом, высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb обладают терапевтической ценностью при лечении пациентов, страдающих заболеваниями, ассоциированными с гиперактивностью альтернативного пути.

В соответствии с этим, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способам ингибирования альтернативного пути у млекопитающего, нуждающегося в этом, где указанные способы включают введение индивидууму композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с доменом сериновой протеазы человеческого MASP (аминокислотные остатки 450-728 в SEQ ID NO: 2) с высокой аффинностью (имеющей K_d менее чем 500 пМ) в количестве, эффективном для ингибирования активации комплемента альтернативного пути у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум страдает заболеванием или расстройством, ассоциированным с альтернативным путем (т.е. заболеванием или расстройством, ассоциированным с гиперактивностью альтернативного пути), такими как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП, включая мокрую и сухую ВДЖП), ишемическо-реперфузионное повреждение, артрит, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, тромботическая микроангиопатия (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (АГУС), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) или ТМА, ассоциированная с трансплантацией), астма, болезнь плотных отложений, олигоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит, черепно-мозговая травма, аспирационная пневмония, эндофтальмит, нейромиеелит зрительного нерва, болезнь Бехчета, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (АБС), волчаночный нефрит, системная красная волчанка (СКВ), диабетическая ретинопатия, увеит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), С3-гломерулопатия, отторжение трансплантата, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализ, сепсис, синдром системного воспалительного ответа (ССВО), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), ANCA-васкулит, антифосфолипидный синдром, атеросклероз, IgA-нефропатия и тяжелая миастения, более подробно описанные ниже.

А. Роль MASP-3 в развитии пароксизмальной ночной гемоглобинурии и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Обзор ПНГ.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), иногда также называемая синдромом Марчафа-вы-Михаэля, представляет собой приобретенное и опасное для жизни заболевание крови. ПНГ может развиваться сама по себе, и ее называют "первичной ПНГ", либо, если она развивается на фоне других заболеваний костного мозга, таких как апластическая анемия, ее называют "вторичной ПНГ". В большинстве случаев ПНГ является первичным заболеванием. ПНГ характеризуется комплемент-индуцированным разрушением эритроцитов (гемолиз), низким числом эритроцитов (анемия), тромбозом и недостаточностью костного мозга. Лабораторные данные по ПНГ показывают изменения, соответствующие внутрисосудистой гемолитической анемии, т.е. низкий гемоглобин, повышенный уровень лактатдегидрогеназы, увеличенное число ретикулоцитов (незрелых эритроцитов, выделяемых костным мозгом вместо разрушенных клеток), повышенный билирубин (продукт разложения гемоглобина) в отсутствии аутореактивных RBC-связывающих антител, как возможной причины.

Отличительной чертой ПНГ является хронический комплемент-опосредованный гемолиз, вызванный нерегулируемой активацией терминальных компонентов комплемента, включая мембрано-атакующий комплекс на поверхности эритроцитов кровотока. Эритроциты при ПНГ подвергаются неконтролируемой активации комплемента и гемолизу из-за отсутствия регуляторов CD55 и CD59 ком-

племента на поверхности эритроцитов (Lindorfer M.A. et al., Blood 115 (11) :2283-91 (2010), Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011)). CD55 и CD59 в избытке экспрессируются на нормальных эритроцитах и регулируют активацию комплемента. CD55 действует как негативный регулятор альтернативного пути, ингибируя сборку комплекса C3-конвертазы альтернативного пути (C3bBbC3bBb) и ускоряя разложение ранее образованной конвертазы, что таким образом приводит к блокированию образования мембрано-атакующего комплекса (МАС). CD59 ингибирует мембрано-атакующий комплекс комплемента непосредственно благодаря связыванию комплекса C5b678 и предотвращению связывания и полимеризации C9.

Хотя гемолиз и анемия являются доминирующими клиническими признаками ПНГ, однако, такое заболевание представляет собой комплексное гематологическое расстройство, которое дополнительно включает тромбоз и недостаточность костного мозга, как часть клинических данных (Risitano et al. Mini Reviews in Med. Chem., 11:528-535 (2011)). На молекулярном уровне ПНГ вызывается аномальной клональной экспансией гемопоэтических стволовых клеток, не имеющих функционального гена PIGA. PIGA представляет собой X-сцепленный ген, кодирующий гликозилфосфатидил-инозит-трансферазу, необходимую для стабильной поверхностной экспрессии GPI-заякоренных гликопротеинов класса А, включая CD55 и CD59. По неизвестным причинам, которые в настоящее время исследуются, гемопоэтические стволовые клетки с дисфункциональным геном PIGA, которые образуются в результате спонтанных соматических мутаций, могут подвергаться клональной экспансии до уровня, при котором их потомство составляет значительную часть периферического пула гемопоэтических клеток. Хотя эритроцитарное и лимфоцитарное потомство клона мутантных стволовых клеток не содержит CD55 и CD59, однако, только эритроциты подвергаются полному лизису после того, как они попадают в кровотоки.

Современное лечение ПНГ включает переливание крови при анемии, использование антикоагулянтов при тромбозе и использование моноклонального антитела экулизумаба (Soliris®), который защищает клетки крови от иммунной деструкции посредством ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-559 (2004)). Экулизумаб (Soliris®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое нацелено на компонент C5 комплемента, блокируя его расщепление C5-конвертазами и, предотвращая тем самым продуцирование C5a и сборку МАС. Лечение пациентов с ПНГ экулизумабом приводит к снижению внутрисосудистого гемолиза, как было определено по уровню лактатдегидрогеназы (LDH), и тем самым к стабилизации гемоглобина, в результате чего, приблизительно половине пациентов не требуется переливания крови (Risitano et al, Mini Reviews in Med Chem, 11:528-535 (2011)). Хотя почти у всех пациентов, проходивших терапию экулизумабом, наблюдались нормальные или почти нормальные уровни LDH (за счет регуляции внутрисосудистого гемолиза), однако, только приблизительно у одной трети пациентов уровень гемоглобина достигал приблизительно 11 г/дл, тогда как у остальных пациентов, проходивших терапию экулизумабом, наблюдались умеренная или тяжелая (т.е. требующая переливания крови) анемия, почти в равных соотношениях (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Как описано в публикации Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11(6) (2011), было продемонстрировано, что у пациентов с ПНГ, которым вводили экулизумаб, наблюдалось большое количество фрагментов C3, связанных с ПНГ-эритроцитами (а у пациентов, не проходивших лечения, этого не наблюдалось). Это открытие привело к признанию того факта, что у пациентов с ПНГ, которым вводили Soliris, ПНГ-эритроциты, которые больше не подвергались гемолизу из-за блокады C5, могли накапливать значительное количество мембраносвязанных фрагментов C3, которые действуют как опсоины, в результате чего происходит их захват ретикулоэндотелиальными клетками посредством специфических рецепторов C3 и последующий внесосудистый гемолиз. Таким образом, при одновременном предотвращении внутрисосудистого гемолиза и его последствий, терапия с использованием экулизумаба просто переориентирует внутрисосудистый гемолиз этих эритроцитов на внесосудистый, что приводит к развитию остаточной не поддающейся лечению анемии у многих пациентов (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Таким образом, помимо использования экулизумаба, необходимо разработать терапевтические стратегии для тех пациентов, у которых развивается внесосудистый гемолиз, опосредуемый фрагментом C3, поскольку этим пациентам по-прежнему требуется переливание эритроцитов. Такие подходы, нацеленные на фрагмент C3, продемонстрировали определенную ценность в экспериментальных системах (Lindorfer et al., Blood 115:2283-91, 2010).

Комплемент-инициирующие механизмы при ПНГ.

Причинно-следственная связь между дефектной поверхностной экспрессией негативных регуляторов CD55 и CD59 комплемента при ПНГ в сочетании с эффективностью экулизумаба в предотвращении внутрисосудистого гемолиза, со всей очевидностью позволяет отнести ПНГ к состоянию, опосредуемому системой комплемента. Хотя эта парадигма получила широкое признание, однако, характер событий, инициирующих активацию комплемента, и путь(и) активации комплемента пока еще остаются неясными. Поскольку CD55 и CD59 негативно регулируют терминальные стадии амплификации в каскаде реакций комплемента, которые являются общими для всех путей инициации комплемента, дефицит этих молекул будет приводить к усиленному образованию и мембранной интеграции мембрано-атакующих комплексов, независимо от того, иницируются ли активация комплемента по лектиновому пути, по класси-

ческому пути или по спонтанному переключению на альтернативный путь. Таким образом, у пациентов с ПНГ любые события активации комплемента, которые приводят к осаждению C3b на поверхности эритроцитов, могут вызвать последующую амплификацию и патологический гемолиз (внутрисосудистый и/или внесосудистый) и вызывать гемолитический криз. Четкое понимание механизма молекулярных событий, инициирующих гемолитический криз у пациентов с ПНГ, остается неясным. Поскольку у пациентов с ПНГ и с гемолитическим кризом, в основном, не наблюдается явного комплемент-инициирующего события, однако, преобладает мнение, что активация комплемента при ПНГ может происходить спонтанно из-за низкого уровня активации альтернативного пути по типу "холостого хода", который впоследствии усиливается в результате неадекватной регуляции терминальной активации комплемента из-за отсутствия CD55 и CD59.

Тем не менее, важно отметить, что по своей природе, ПНГ обычно развивается или обостряется после определенных событий, таких как инфекция или травма (Risitano, *Biologics* 2:205-222 (2008)), которые, как было показано, могут стимулировать активацию комплемента. Эта реакция активации комплемента не зависит от имеющегося у хозяина иммунитета к провоцирующему патогену, и, следовательно, скорее всего, она не происходит по классическому пути. Скорее всего, эта реакция активации комплемента инициируется лектином, связывающимся с чужеродными или "аутомодифицированными" углеводными паттернами, экспрессируемыми на поверхности микробных агентов или поврежденной ткани хозяина. Таким образом, события, инициирующие гемолитический криз при ПНГ, тесно связаны с активацией комплемента, инициированной лектинами. Это значительно повышает вероятность того, что активация по лектиновому пути обеспечивает инициирующий стимул, который, в конечном счете, приводит к гемолизу у пациентов с ПНГ.

Благодаря использованию хорошо определенных патогенов, которые активируют комплемент посредством лектинов в качестве экспериментальных моделей для распознавания каскадов активации на молекулярном уровне, авторами было продемонстрировано, что в зависимости от провоцирующего микроба активация комплемента может инициироваться либо LEA-2, либо LEA-1, что приводит к опсонизации и/или лизису. Этот же принцип двойных ответов (т.е. опсонизации и/или лизиса) на событие инициации лектином, вероятно, также применим и к другим типам инфекционных агентов, или к активации комплемента лектинами после повреждения ткани хозяина или к другим событиям активации комплемента лектином, которые могут вызывать ПНГ. На основе такого двойственного действия лектинового пути, авторами изобретения был сделан вывод, что LEA-2- и/или LEA-1-инициируемая активация комплемента у пациентов с ПНГ стимулирует опсонизацию и/или лизис C3b-содержащих эритроцитов с последующим их внесосудистым и внутрисосудистым гемолизом. Таким образом, при подтверждении ПНГ, ингибирование LEA-1 и LEA-2, предположительно, позволит устранить внутрисосудистый и внесосудистый гемолиз, что обеспечит тем самым значительное преимущество по сравнению с ингибитором C5, а именно, экулизумабом.

Было установлено, что воздействие *S.pneumoniae* преимущественно запускает лектин-зависимую активацию LEA-2, что приводит к опсонизации этого микроба с C3b. Поскольку *S.pneumoniae* устойчива к MAC-опсонированному лизису, его выведение из кровотока происходит посредством опсонизации с C3b. Эта опсонизация и последующее ее удаление из кровотока является LEA-2-зависимым, на что указывала нарушенная бактериальная регуляция у MASP-2-дефицитных мышей и у мышей, обработанных моноклональными анти-MASP-2 антителами (*PLOS Pathog.* 8: E1002793 (2012)).

При изучении роли LEA-2 во врожденных ответах у хозяина на микробные агенты авторами были протестированы дополнительные патогены. Резко отличающийся результат наблюдался при исследовании *Neisseria meningitidis* как организма-модели. *N.meningitidis* также активирует комплемент посредством лектинов, и такая активация комплемента необходима для ослабления инфицирования *N.meningitidis* у хозяина, ранее не подвергавшегося такому инфицированию. Однако LEA-2 не играет какой-либо протективной функциональной роли в этом ответе у хозяина. Как показано на фиг. 6 и 7, блокада LEA-2 посредством генетической элиминации MASP-2 не снижала выживаемость после инфицирования *N.meningitidis*. Напротив, блокада LEA-2 посредством элиминации MASP-2 приводила к значительному повышению выживаемости (фиг. 6 и 7), а также к улучшению оценок заболеваемости (фиг. 9) в этих исследованиях. Блокада LEA-2 путем введения анти-MASP-2 антитела давала такой же результат (фиг. 10), что исключает вторичные или компенсирующие эффекты у нокаут-мышей в качестве возможной причины. Эти благоприятные результаты у LEA-2-дефицитных животных были ассоциированы с более быстрой элиминацией *N.meningitidis* из крови (фиг. 8). Кроме того, как описано в настоящей заявке, инкубирование *N.meningitidis* с нормальной человеческой сывороткой приводило к уничтожению *N.meningitidis* (фиг. 11). Добавление функционального моноклонального антитела, специфичного к человеческому MASP-2, которое блокирует LEA-2, но не введение моноклонального антитела контрольного изотипа, может повышать такой литический ответ. Тем не менее, этот процесс зависит от лектинов и, по меньшей мере частично, от функциональной системы комплемента, поскольку MBL-дефицитная человеческая сыворотка или термоинактивированная человеческая сыворотка не способна уничтожать *N.meningitidis* (фиг. 11). В целом, эти новые данные позволяют предположить, что инфекции *N.meningitidis* в присутствии функциональной системы комплемента регулируются лектин-зависимым, но не зависимым от LEA-2

путем активации комплемента.

Гипотеза о том, что LEA-1 может представлять собой путь комплемента, ответственный за лектин-зависимый лизис *N.meningitidis*, была проверена с использованием пробы сыворотки, взятой у ЗМС-пациента. Этот пациент был гомозиготным по нонсенс-мутации в экзоне 12 гена MASP-1/3. В результате, у этого пациента отсутствовал функциональный белок MASP-3, и наоборот, присутствовало достаточное количество комплемента (экзон 12 является специфичным к транскрипту MASP-3, при этом мутация не оказывает какого-либо влияния на функцию или уровни экспрессии MASP-1) (см. *Nat. Genet.* 43(3):197-203 (2011)). Нормальная человеческая сыворотка эффективно уничтожает *N.meningitidis*, но термоинактивированная сыворотка, дефицитная по MBL (одна из молекул распознавания лектинового пути) и MASP-3-дефицитная сыворотка были не способны уничтожить *N.meningitidis* (фиг. 12). Таким образом, LEA-1, очевидно, опосредует уничтожение *N.meningitidis*. Этот вывод был подтвержден с использованием проб сыворотки, взятых у нокаут-мышей. Хотя комплемент-содержащая нормальная мышьяная сыворотка легко уничтожала *N.meningitidis*, однако, MBL-дефицитная или MASP-1/3-дефицитная мышьяная сыворотка была неэффективной для ее использования в качестве термоинактивированной сыворотки, которая не содержала функционального комплемента (фиг. 13). С другой стороны, MASP-2-дефицитная сыворотка эффективно уничтожала *N.meningitidis*.

Эти данные подтвердили ранее неизвестную двойственность лектинового пути благодаря обнаружению существования отдельных LEA-2- и LEA-1-путей лектин-зависимой активации комплемента. В примерах, описанных выше, LEA-2 и LEA-1 не являются избыточными и опосредуют различные функциональные результаты. Эти данные свидетельствуют о том, что определенные типы активаторов лектинового пути (включая, но не ограничиваясь ими, *S.pneumonia*) преимущественно инициируют активацию комплемента посредством LEA-2, что приводит к опсонизации, в то время как другие типы активаторов (например, *N.meningitidis*) преимущественно инициируют активацию комплемента посредством LEA-1 и стимулируют цитолитические процессы. Однако эти данные не указывают на то, что LEA-2 обязательно будет приводить к опсонизации, а LEA-1 к цитолитическим процессам, поскольку опсонизацию и/или лизис могут опосредовать оба пути в других условиях.

В контексте лектин-зависимой активации комплемента под действием *N.meningitidis*, цепи LEA-2 и LEA-1, очевидно, конкурируют друг с другом, поскольку блокада LEA-2 усиливает LEA-1-зависимую лизитическую деструкцию организма *in vitro* (фиг. 13). Как подробно описано выше, этот вывод можно объяснить увеличением вероятности того, что комплексы лектин-MASP-1 будут находиться в непосредственной близости от комплексов лектин-MASP-3 в отсутствие MASP-2, что будет способствовать усилению активации LEA-1 и, тем самым, стимулировать более эффективный лизис *N.meningitidis*. Поскольку лизис *N.meningitidis* является основным защитным механизмом у хозяина, ранее не подвергавшегося инфицированию, то блокада LEA-2 *in vivo* повышает клиренс *N.meningitidis* и приводит к более эффективному лизису бактерий.

Хотя в обсуждаемых выше примерах проиллюстрированы противоположные эффекты LEA-2 и LEA-1 относительно результатов после инфицирования *N.meningitidis*, однако, могут существовать и другие условия, при которых оба LEA-2 и LEA-1 могут действовать синергически и давать определенный результат. Как подробно описано ниже, в других случаях патологической активации комплемента лектинами, например, присутствующими при ПНГ, LEA-2-и LEA-1-индуцированная активация комплемента может действовать синергически и вносить свой вклад в общую патологию ПНГ. Кроме того, как описано в настоящей заявке, MASP-3 также вносит свой вклад в лектин-независимое превращение фактора В и фактора D, которое может наблюдаться в отсутствие Ca^{++} и которое обычно приводит к превращению C3bB в C3bBbC3bBb и про-фактора D в фактор D, которые могут также вносить свой вклад в патологию ПНГ.

Биология и ожидаемая функциональная активность при ПНГ.

В этом разделе описано ингибирующее воздействие блокады LEA-2 и LEA-1 на гемолиз *in vitro* у модели с ПНГ. Эти данные подтверждают ценность LEA-2-блокирующих агентов (включая, но не ограничиваясь ими, антитела, которые связываются с MASP-2 и блокируют функцию MASP-2) и LEA-1-блокирующих агентов (включая, но не ограничиваясь ими, антитела, которые связываются с MASP-3 и блокируют функцию MASP-1-опосредованной активации MASP-3, MASP-3 или то и другое) для лечения пациентов, страдающих ПНГ одного или более типов, а также ценность использования ингибиторов LEA-2 и/или LEA-1 и/или MASP-3-зависимой и лектин-независимой активации комплемента (включая ингибиторы MASP-2, ингибиторы MASP-3 и ингибиторы двойного действия или биспецифические ингибиторы MASP-2/MASP-3 или MASP-1/MASP-2 и ингибиторы, специфичные ко всем MASP-1/MASP-2/MASP-3) для ослабления эффектов внесосудистого гемолиза, опосредованного фрагментом C3, у пациентов с ПНГ, которые проходили терапию ингибитором C5, таким как экулизумаб.

Ингибиторы MASP-2, блокирующие опсонизацию и внесосудистый гемолиз ПНГ-эритроцитов посредством ретикулоэндотелиальной системы.

Как подробно описано выше, у пациентов с ПНГ развивается анемия по двум различным механизмам клиренса эритроцитов из кровотока: внутрисосудистого гемолиза посредством активации мембрано-атакующего комплекса (MAC) и внесосудистого гемолиза после опсонизации с C3b и последующим

клиренсом после связывания с рецептором комплемента и поглощением ретикулоэндотелиальной системой. Внутрисосудистый гемолиз в значительной степени предотвращается в том случае, когда пациент принимает экулизумаб. Поскольку экулизумаб блокирует терминальный литический эффекторный механизм, который наблюдается после события комплемента-инициирующей активации, а также после опсонизации, то экулизумаб не блокирует внесосудистый гемолиз (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Вместо этого, эритроциты, которые подвергались гемолизу у пациентов с ПНГ, не проходивших лечения, могли теперь накапливать на своей поверхности активированные белки C3b, что приводило к усилению поглощения ретикулоэндотелиальной системой и усиливало их внесосудистый гемолиз. Таким образом, лечение экулизумабом эффективно переориентирует внутрисосудистый гемолиз эритроцитов на возможный внесосудистый гемолиз. В результате, у некоторых пациентов с ПНГ, которые принимали экулизумаб, наблюдалась анемия. Из этого следует, что агенты, которые блокируют предварительную активацию комплемента и предотвращают опсонизацию ПНГ-эритроцитов, могут быть особенно подходящими для блокирования внесосудистого гемолиза, иногда наблюдаемого при введении экулизумаба.

Представленные здесь микробиологические данные позволяют предположить, что LEA-2 часто представляет собой доминирующий путь лектин-зависимой опсонизации. Кроме того, при оценке лектин-зависимой опсонизации (определенной по осаждению C3b) на трех прототипических поверхностях активации лектина (маннан, фиг. 17A; зимозан, фиг. 17B и *S. pneumonia*; фиг. 17C), было обнаружено, что LEA-2, очевидно, представляет собой доминирующий путь лектин-зависимой опсонизации в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca^{++} , где все пути комплемента являются активными). В этих экспериментальных условиях MASP-2-дефицитная сыворотка (в которой отсутствует LEA-2), по существу, менее эффективна в отношении опсонизации тестируемых поверхностей, чем сыворотка дикого типа. MASP-1/3-дефицитная сыворотка (в которой отсутствует LEA-1) также является дефектной, хотя этот эффект выражен значительно менее по сравнению с сывороткой, в которой отсутствует LEA-2. Относительная величина вклада LEA-2 и LEA-1 в индуцированную лектином опсонизацию дополнительно проиллюстрирована на фиг. 18A-18C. Хотя сообщалось, что альтернативный путь комплемента поддерживает опсонизацию лектин-активирующих поверхностей в отсутствие лектинового пути или классического пути (Selandar et al., J. Clin. Invest. 116(5):1425-1434 (2006)), однако, альтернативный путь сам по себе (как было определено в условиях анализа без Ca^{++}) является значительно менее эффективным, чем LEA-2- и LEA-1-инициированные процессы, описанные в настоящей заявке. При экстраполяции эти данные свидетельствуют о том, что опсонизация ПНГ-эритроцитов может также преимущественно инициироваться под действием LEA-2 и, в меньшей степени, LEA-1 (возможно усиление такой опсонизации в петле амплификации по альтернативному пути), а не в результате лектин-независимой активации альтернативного пути. Таким образом, можно предположить, что ингибиторы LEA-2 могут быть наиболее эффективными в ограничении опсонизации и предотвращении внесосудистого гемолиза при ПНГ. Однако, признание того факта, что другие лектины, а не MBL, такие как фиколины, связываются с неуглеводными структурами, такими как ацетилированные белки, и что MASP-3 преимущественно ассоциируется с Н-фиколином (Skjoedt et al., Immunobiol. 215:921-931, 2010), оставляет открытым вопрос о возможности значительной роли LEA-1 в опсонизации эритроцитов, ассоциированных с ПНГ. Следовательно, ожидается, что ингибиторы LEA-1 будут давать дополнительные антиопсонизирующие эффекты, и что комбинация ингибиторов LEA-1 и LEA-2 будет оптимальной и будет давать наиболее эффективное лечение путем ограничения опсонизации и внесосудистого гемолиза у пациентов с ПНГ. Таким образом, LEA-2 и LEA-1 действуют аддитивно или синергически при стимуляции опсонизации, и, как ожидается, перекрестно реагирующий или биспецифический ингибитор LEA-1/LEA-2 будет наиболее эффективным в блокировании опсонизации и внесосудистого гемолиза при ПНГ.

Роль ингибиторов MASP-3 в ПНГ.

С использованием модели ПНГ *in vitro* авторами было показано, что активация комплемента и последующий гемолиз при ПНГ действительно инициируется активацией LEA-2 и/или LEA-1 и что такая активация не является независимой от альтернативного пути. В этих исследованиях использовали маннан-сенсibilизированные эритроциты мышей различных видов, включая эритроциты мышей, дефицитных по C3u (важному негативному регулятору терминального пути комплемента у мышей), а также эритроциты CD55/CD59-дефицитных мышей, у которых отсутствовали те же самые регуляторы комплемента, которые отсутствуют у пациентов с ПНГ). Когда маннан-сенсibilизированные C3u-дефицитные эритроциты подвергались воздействию человеческой сывороткой с достаточным количеством комплемента, эти эритроциты подвергались эффективному гемолизу в 3%-ной сыворотке (фиг. 19 и 20), в то время как дефицитная по комплементу сыворотка (Н: термоинактивированная) не обладала гемолитической функцией. Примечательно, что сыворотка с достаточным количеством комплемента, где LEA-2 блокировалась добавлением анти-MASP-2 антитела, обладала пониженной гемолитической активностью, а поэтому для эффективного гемолиза была необходима 6%-ная сыворотка. Аналогичные наблюдения были сделаны при тестировании CD55/CD59-дефицитных эритроцитов (фиг. 22). Человеческая сыворотка с достаточным количеством комплемента, в которую было добавлено моноклональное анти-MASP-2 антитело (т.е. сыворотка, в которой LEA-2 ингибировалась), была примерно в два раза менее эффективной для поддержания гемолиза, чем необработанная сыворотка. Кроме того, более высокие concentra-

ции LEA-2-блокированной сыворотки (т.е. обработанной моноклональным анти-MASP-2 антителом) были необходимы для стимуляции эффективного гемолиза необработанных эритроцитов дикого типа по сравнению с необработанной сывороткой (фиг. 21).

Еще более удивительно то, что сыворотка ЗМС-пациента, гомозиготного по дисфункциональному белку MASP-3 (и, следовательно, не содержащая LEA-1), была абсолютно неспособна осуществлять гемолиз маннан-сенситизированных Сгу-дефицитных эритроцитов (фиг. 20 и 21). Аналогичный результат наблюдался при использовании несенситизированных нормальных эритроцитов: как показано на фиг. 21, LEA-1-дефицитная сыворотка, выделенная у ЗМС-пациента, была совершенно неэффективной в опосредовании гемолиза. В целом, эти данные показали, что LEA-2 вносит значительный вклад в ответ на внутрисосудистый гемолиз, а LEA-1 представляет собой преобладающий комплемент-инициирующий путь, приводящий к гемолизу. Таким образом, хотя предполагается, что LEA-2-блокирующие агенты значительно снижают уровень внутрисосудистого гемолиза эритроцитов у пациентов с ПНГ, однако, считается, что LEA-1-блокирующие агенты должны давать более выраженный эффект и в значительной степени устранить опосредованный комплементом гемолиз.

Следует отметить, что сыворотка LEA-1-дефицитного ЗМС-пациента, используемая в этом исследовании, имела пониженный, но функциональный альтернативный путь при тестировании в стандартных условиях анализа альтернативного пути (фиг. 15). Эти данные позволяют предположить, что LEA-1 вносит более значительный вклад в гемолиз, чем активность альтернативного пути, как это было определено путем экспериментального исследования ПНГ. В заключение следует отметить, что LEA-1-блокирующие агенты будут, по меньшей мере, такими же эффективными, как и агенты, блокирующие других альтернативные пути и способствующие предотвращению или устранению внутрисосудистого гемолиза у пациентов с ПНГ.

Роль ингибиторов MASP-2 в ПНГ.

Представленные здесь данные позволяют предположить о наличии нижеследующих механизмов патогенеза анемии при ПНГ: внутрисосудистого гемолиза, вызываемого нерегулируемой активацией терминальных компонентов комплемента и лизиса эритроцитов в результате образования MAC, который инициируется преимущественно, хотя и не исключительно, LEA-1, и внесосудистого гемолиза, вызываемого опсонизацией эритроцитов под действием C3b, которая, как предполагается, инициируется преимущественно LEA-2. Хотя роль LEA-2 в инициации активации комплемента и стимуляции образования MAC и гемолиза является очевидной, однако, этот процесс оказался значительно менее эффективным, чем LEA-1-инициированная активация комплемента, приводящая к гемолизу. Таким образом, предполагается, что LEA-2-блокирующие агенты значительно снижают внутрисосудистый гемолиз у пациентов с ПНГ, хотя такая терапевтическая активность, как и ожидалось, является лишь частичной. По сравнению с этим, ожидается, что LEA-1-блокирующие агенты будут в значительно большей степени снижать внутрисосудистый гемолиз у пациентов с ПНГ.

Внесосудистый гемолиз является менее драматичным, но не менее важным механизмом деструкции эритроцитов, приводящим к анемии при ПНГ, и является, главным образом, результатом опсонизации под действием C3b, который, как предполагается, преимущественно опосредуется LEA-2. Таким образом, LEA-2-блокирующие агенты, как можно ожидать, преимущественно блокируют опсонизацию эритроцитов и последующий внесосудистый гемолиз при ПНГ. Предполагается, что такая уникальная терапевтическая активность LEA-2-блокирующих агентов значительно повысит эффективность лечения всех пациентов с ПНГ, поскольку в настоящее время не существует какого-либо способа лечения пациентов с ПНГ, у которых наблюдается этот патогенный процесс.

Ингибиторы LEA-2 как дополнительное средство для лечения помимо ингибиторов LEA-1 или агентов, блокирующих терминальный путь комплемента.

Представленные здесь данные подробно описывают два патогенных механизма клиренса эритроцитов и анемию при ПНГ, которые могут быть мишенями, отдельно или в комбинации, и на которые могут быть направлены терапевтические средства различных классов: внутрисосудистый гемолиз, который инициируется преимущественно, хотя и не исключительно, LEA-1, и который таким образом, как предполагается, можно эффективно предотвратить с помощью LEA-1-блокирующего агента; и внесосудистый гемолиз, который вызывается опсонизацией C3b, индуцируемой преимущественно LEA-2, и который, таким образом, можно эффективно предотвратить с помощью LEA-2-блокирующего агента.

Хорошо известно, что внутрисосудистый и внесосудистый механизмы гемолиза приводят к анемии у пациентов с ПНГ (Risitano et al., Blood 113:4094-4100 (2009)). Таким образом, предполагается, что LEA-1-блокирующий агент, который предотвращает внутрисосудистый гемолиз в комбинации с LEA-2-блокирующим агентом, который, главным образом, предотвращает внесосудистый гемолиз, будет более эффективным, чем любой один из этих агентов, в предупреждении анемии, которая развивается у пациентов с ПНГ. Действительно, предполагается, что комбинация LEA-1- и LEA-2-блокирующих агентов будет устранять все соответствующие механизмы инициации комплемента при ПНГ и, таким образом, блокировать все симптомы анемии при ПНГ.

Также известно, что C5-блокирующие агенты (такие как экулизумаб) эффективно блокируют внутрисосудистый гемолиз, но не препятствуют опсонизации. В результате, у некоторых пациентов с ПНГ,

которым вводили анти-C5 антитело, сохранялась существенная остаточная анемия вследствие внесосудистого гемолиза, опосредованного LEA-2, который остается неустранимым. Таким образом, предполагается, что C5-блокирующий агент (такой как экулизумаб), который предотвращает внутрисосудистый гемолиз в комбинации с LEA-2-блокирующим агентом, который уменьшает внесосудистый гемолиз, будут более эффективными, чем любой из отдельно взятых агентов, в предотвращении анемии, которая развивается у пациентов с ПНГ.

Также предполагается, что другие агенты, которые блокируют терминальную петлю амплификации системы комплемента, приводящей к активации C5 и к осаждению MAC (включая, но не ограничиваясь ими, агенты, которые блокируют пропердин, фактор В или фактор D или усиливают ингибирующую активность фактора I, фактора Н или других комплемент-ингибирующих факторов), ингибируют внутрисосудистый гемолиз. Однако предполагается, что эти агенты не препятствуют LEA-2-опосредованной опсонизации у пациентов с ПНГ. В результате, у некоторых пациентов с ПНГ, которым вводили такие агенты, сохранялась существенная остаточная анемия вследствие внесосудистого гемолиза, опосредованного LEA-2, который остается неустранимым. Таким образом, предполагается, что лечение такими агентами, которые предотвращают внутрисосудистый гемолиз, в комбинации с LEA-2-блокирующим агентом, который уменьшает внесосудистый гемолиз, будут более эффективными, чем любой из отдельно взятых агентов, в предотвращении анемии, развивающейся у пациентов с ПНГ. Действительно, предполагается, что комбинация таких агентов и LEA-2-блокирующего агента будет устранять все соответствующие механизмы разрушения эритроцитов при ПНГ и, таким образом, блокировать все симптомы анемии при ПНГ.

Использование мультиспецифических, биспецифических или панспецифических антител против LEA-1 и LEA-2 для лечения ПНГ.

Как подробно описано выше, использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, а поэтому, взятые в комбинации, блокируют все события активации комплемента, которые опосредуют внутрисосудистый, а также внесосудистый гемолиз, как и предполагается, будет обеспечивать лучший клинический результат при лечении пациентов с ПНГ. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула, обладающая комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью, будет эффективно блокировать внутрисосудистый, а также внесосудистый гемолиз и предотвращать анемию при ПНГ. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1 и уменьшает уровень LEA-2, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2, а также блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1 и уменьшает уровень LEA-2, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2, а также блокирует LEA-2. На основе общего сходства последовательностей и архитектуры белков, можно также сделать вывод, что можно получить стандартное антитело с двумя идентичными сайтами связывания, которые будут специфически связываться с MASP-1, MASP-2 и MASP-3 в функциональной форме, обеспечивая, тем самым, функциональную блокаду LEA-1 и LEA-2. Такое антитело с активностью, ингибирующей все MASP, как и предполагается, будет блокировать как внутрисосудистый, так и внесосудистый гемолиз, и, таким образом, будет эффективным для лечения анемии у пациентов с ПНГ.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как ПНГ.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего ПНГ, или индивидуума с риском развития ПНГ, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития ПНГ у индивидуума.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), или индивидуума с риском развития пароксизмальной ночной гемоглобинурии, где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество описанного здесь моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, для лечения ПНГ или снижения риска разви-

тия ПНГ у индивидуума, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) переменную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция повышает степень жизнеспособности эритроцитов у индивидуума, страдающего ПНГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума, страдающего ПНГ, или у индивидуума с риском развития ПНГ, наблюдаются один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из: (i) снижения гемоглобина до уровней ниже нормы, (ii) снижения числа тромбоцитов до уровней ниже нормы; (iii) увеличения числа ретикулоцитов до уровней выше нормы; и (iv) повышения билирубина до уровней выше нормы. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят индивидууму, страдающему ПНГ, или индивидууму с риском развития ПНГ, системно (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально или в виде ингаляции). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум, страдающий ПНГ, или индивидуум с риском развития ПНГ ранее проходил лечение или в настоящее время проходит лечение терминальным ингибитором комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ также включает введение индивидууму терминального ингибитора комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения терминальным ингибитором комплемента является гуманизованное анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения терминальным ингибитором комплемента является экулизумаб.

В. Роль MASP-3 в развитии возрастной дегенерации желтого пятна и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП) является главной причиной ухудшения зрения и слепоты у пожилых людей, и в развитых странах, приблизительно в 50% случаев, она приводит к слепоте. Заболеваемость ВДЖП у взрослых составляет приблизительно 3%, и с возрастом увеличивается таким образом, что почти две трети населения в возрасте старше 80 лет имеют некоторые признаки такого заболевания. По оценкам специалистов более чем 1,75 миллиона человек в Соединенных Штатах страдают прогрессирующей ВДЖП, и ее распространенность увеличивается с возрастом, и предполагается, что к 2020 году число заболевших составит почти 3 миллиона человек (Friedman D.S. et al., Arch. Ophthalmol. 122:564-572, 2004). ВДЖП представляет собой патологию пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), что приводит к дегенерации фоторецепторов верхнего слоя центральной сетчатки или желтого пятна и потери центрального зрения. Ранние и промежуточные формы ВДЖП характеризуются прогрессирующими отложениями друз, желтоватой субстанцией, содержащей липид, белок, липопротеин и клеточный дебрис в субретинальном пространстве, прилежащем к ПЭС, а также пигментными нарушениями сетчатки. Прогрессирующая ВДЖП состоит из двух клинических подтипов: не-неоваскулярной региональной атрофической ("сухой") ВДЖП и неоваскулярной экссудативной ("мокрой") ВДЖП. Хотя сухая ВДЖП составляет 80-90% от всех случаев прогрессирующей ВДЖП, однако, в большинстве случаев, внезапная и серьезная потеря зрения наблюдается у пациентов с мокрой ВДЖП. Неизвестно, имеют ли эти два типа ВДЖП различные фенотипы, связанные с подобными патологиями, либо они представляют собой два различных заболевания. На данный момент не существует какого-либо лечения сухой ВДЖП, одобренного специалистами Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Лечение мокрой ВДЖП, апробированное специалистами FDA, включает инъекции антиангиогенных лекарственных средств (ранибизумаба, пегаптана-натрия, афлиберцепта) в стекловидное тело, лазерную терапию, фотодинамическую лазерную терапию и имплантацию телескопа.

Этиология и патофизиология ВДЖП являются сложными и пока еще полностью не изучены. Существует ряд данных, подтверждающих роль нарушения регуляции системы комплемента в патогенезе ВДЖП. Были проведены исследования по ассоциации генов, в результате чего было идентифицировано множество генетических локусов, ассоциированных с ВДЖП, включая гены, кодирующие целый ряд белков, факторов и регуляторов комплемента. Это заболевание в наибольшей степени ассоциируется с полиморфизмом в гене фактора Н комплемента (CFH), причем, в случае варианта с Y402N-гомозиготами, риск развития ВДЖП возрастает приблизительно в 6 раз, а в случае гетерозигот, приблизительно в 2,5 раза по сравнению с генотипом без риска развития ВДЖП (Khandhadia S. et al., Immunobiol. 217:127-146, 2012). Мутации в других генах, кодирующих пути комплемента, также были ассоциированы с повышенным или пониженным риском развития ВДЖП, включая фактор В комплемента (CFB), C2, C3, фактор I и CFH-родственные белки 1 и 3 (Khandhadia et al.). Иммуногистохимические и протеомные исследования донорных глаз у пациентов ВДЖП показали, что уровни белков каскада реакций комплемента были увеличены и локализованы в друзах (Issa P.C. et al., Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 249:163-174, 2011). Кроме того, у пациентов с ВДЖП наблюдалась повышенная системная активация комплемента, как было определено в анализе периферической крови (Issa et al., 2011, см. выше).

В патогенезе ВДЖП, альтернативный путь комплемента, очевидно, является более релевантным, чем классический путь. C1q, основной компонент распознавания активации классического пути, не был обнаружен в друзах с помощью иммуногистохимических анализов (Mullins et al., *FASEB J.* 14:835-846, 2000; Johnson et al., *Exp. Eye Res.* 70:441-449, 2000). Исследования генетических ассоциаций были проведены на генах CFH и CFB. Эти белки участвуют в петле амплификации альтернативного пути, причем CFH представляет собой жидкофазный ингибитор, а CFB представляет собой активирующий протеазный компонент альтернативного пути. Y402-вариант CFH влияет на взаимодействие с лигандом, включая связывание с С-реактивным белком, гепарином, М-белком и гликозаминогликанами. Это модифицированное связывание с лигандами может уменьшить связывание с клеточными поверхностями, что, в свою очередь, может приводить к снижению степени разложения фрагмента активации C3b, опосредованного фактором I, и к нарушению регуляции C3-конвертазы альтернативного пути, и тем самым к избыточной активации альтернативного пути (Khandhadia et al., 2012, см. выше). Модификации в гене CFB ассоциируются с защитным эффектом при развитии ВДЖП. Функциональный вариант fB32Q имел в 4 раза меньшую аффинность связывания с C3b, чем вариант fB32R, ответственный за риск развития заболевания, что приводило к снижению уровня образования C3-конвертазы (Montes T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:4366-4371, 2009).

Комплемент-инициирующие механизмы при ВДЖП.

Описанные выше исследования генетических сцеплений у человека свидетельствуют о важной роли системы комплемента в патогенезе ВДЖП. Кроме того, продукты активации комплемента в большом количестве присутствуют в друзах (Issa P.C. et al., *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249:163-174, 2011), которые представляют собой характерные патологические поражения при мокрой и сухой ВДЖП. Тем не менее, природа событий, инициирующих активацию комплемента, и участвующий(е) в них путь(и) активации комплемента пока еще полностью не изучены.

Важно отметить, что отложения в друзах состоят из клеточного дебриса и продуктов реакции окисления, происходящей в сетчатке, которые накапливаются под ПЭС в глазах по мере старения. Кроме того, важную роль, очевидно, играет окислительный стресс (Cai et al., *Front Biosci.* 17:1976-95, 2012), и было показано, что он вызывает активацию комплемента в ПЭС (J. Biol. Chem, 284 (25):16939-47, 2009). Широко известно, что окислительный стресс и повреждение клеток или тканей активируют лектины системы комплемента. Так, например, Collard и др. показали, что эндотелиальные клетки, подвергаемые окислительному стрессу, запускают избыточное осаждение комплемента, опосредованное лектинами (Collard C.D. et al., *Mol. Immunol.* 36 (13-14): 941-8, 1999; Collard C.D. et al., *Am. J. Pathol.*, 156(5): 1549-56, 2000), и что блокада связывания с лектином и лектин-зависимой активации комплемента улучшает результаты в экспериментальных моделях поражения окислительным стрессом (Collard C.D. et al., *Am. J. Pathol.*, 156(5):1549-56, 2000). Таким образом, вероятно, что продукты окислительных реакций, присутствующие в друзах, также активируют комплемент посредством лектинов. В результате можно сделать вывод, что лектин-зависимая активация комплемента может играть ключевую роль в патогенезе ВДЖП.

Роль системы комплемента была оценена у мышей с моделью ВДЖП. В мышинной модели лучевых поражений экспериментальная модель дегенерации фоторецептора, вызываемой окислительным стрессом у нокаут-мышей с элиминацией классического пути (C1q α -/- на C57BL/6-теневом фенотипе) имела такую же чувствительность к лучевому поражению, как и однопометных мышей дикого типа, тогда как элиминация фактора D комплемента альтернативного пути (CFD-/-) способствовала защите от лучевого поражения (Rohrer B. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:5282-5289, 2007). В мышинной модели хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ), индуцированной лазерной фотокоагуляцией мембраны Бруха, у нокаут-мышей без фактора В комплемента (CFB-/-) вырабатывалась защита от ХНВ по сравнению с мышами дикого типа (Rohrer B. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:3056-3064, 2009). В той же самой модели внутривенное введение рекомбинантной формы фактора Н комплемента, нацеленное на сайты активации комплемента (CR2-FH), приводило к снижению степени ХНВ. Этот протективный эффект наблюдался в том случае, когда CR2-FH вводили во время лазерного повреждения или во время терапии (после лазерного повреждения). Терапевтический вариант CR2-FH для лечения человека (ТТ30) был также эффективным и у мышей с моделью ХНВ (Rohrer B. et al. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 28:402-409, 2012). Поскольку Fb активируется под действием LEA-1, и поскольку MASP-1 и MASP-3 участвуют в созревании фактора D, то эти результаты указывают на то, что ингибиторы LEA-1 могут давать терапевтический эффект у пациентов с ВДЖП. Кроме того, результаты, полученные в недавних исследованиях фазы 2, показали, что ежемесячная интравитреальная инъекция лампализумаба (ранее обозначаемого FCFD4514S и называемого антителом против фактора D, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент гуманизированного моноклонального антитела, направленного против фактора D) приводила к снижению степени прогрессирования региональной атрофии в определенном участке у пациентов с региональной атрофией, вызываемой ВДЖП (Yaspan B.L. et al., *Sci. Transl. Med.* 9, Issue 395, June 21, 2017).

Первые экспериментальные исследования на грызунах с моделью ВДЖП с использованием MBL-дефицитных мышей не подтвердили важную роль лектинового пути в патогенной активации комплемента (Rohrer et al., *Mol. Immunol.* 48:e1-8, 2011). Однако MBL представляет собой только один из нескольких лектинов, и лектины, не являющиеся MBL, могут вызывать активацию комплемента при ВДЖП.

Действительно, авторы, в своей предыдущей работе показали, что MASP-2, т.е. скорость-ограничивающая сериновая протеаза, которая крайне необходима для функционирования лектинового пути, играет критическую роль в ВДЖП. Как описано в патенте США № 7919094 (переуступленном Omeros Corporation), который вводится в настоящее описание посредством ссылки, MASP-2-дефицитные мыши и мышши, обработанные анти-MASP-2 антителом, были защищены в мышшиной модели индуцированной лазером ХНВ, т.е. подтвержденной преclinical модели мокрой ВДЖП (Ryan et al., Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII:707-745, 1979). Таким образом, ингибиторы LEA-2, как предполагается, эффективно предотвращают ХНВ и улучшают результаты лечения у пациентов с ВДЖП.

Таким образом, с учетом всего вышесказанного, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 должны давать независимый терапевтический эффект при ВДЖП. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента, или они могут обеспечивать эффективное лечение для подгрупп пациентов более широкого спектра. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения возрастной дегенерации желтого пятна (мокрой и сухой форм) путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество MASP-1-ингибирующего агента, MASP-3-ингибирующего агента или комбинации MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему таким состоянием. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена местно в глаза, например, путем орошения, интравитреального введения или нанесения композиции в форме геля, мази или капель. Альтернативно, MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ согласно этому аспекту изобретения дополнительно включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента у индивидуума, страдающего возрастной дегенерацией желтого пятна, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, нуждающемуся в этом. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат у пациентов с ВДЖП по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1 а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2, а также блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующая композиция может быть введена местно в глаза, например, путем орошения, интравитреального введения или нанесения композиции в форме геля, мази или капель. Альтернативно, MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты, или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных ком-

позиций), или ограниченного ряда введений для лечения ВДЖП. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения ВДЖП.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как ВДЖП.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего ВДЖП или индивидуума с риском развития ВДЖП, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития ВДЖП у индивидуума. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего ВДЖП, или индивидуума с риском развития ВДЖП, где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество описанного здесь моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, для лечения ВДЖП или снижения риска развития ВДЖП у индивидуума, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

С. Роль MASP-3 в развитии ишемическо-реперфузионного повреждения и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Ишемия ткани является основой клинических расстройств широкого спектра. Хотя своевременное восстановление кровотока имеет очень важное значение для сохранения поврежденной ишемией ткани, однако, уже давно признано, что реперфузия, которая может происходить либо спонтанно, либо посредством терапевтического лечения, может приводить к дополнительному повреждению ткани, т.е. к феномену, который был назван ишемическо-реперфузионным (И/Р) повреждением (Eltzschig H.K. and Tobias, E., *Nat. Med.* 17:1391-1401, 2011). И/Р-повреждение может поражать отдельные органы, такие как сердце (острый коронарный синдром), почки (острое повреждение почек), кишечник (кишечное И/Р) и головной мозг (инсульт). И/Р-повреждение может также вызывать поражение нескольких органов, такое как основные повреждения и последующая реперфузия (недостаточность многих органов), остановка кровообращения (гипоксия головного мозга, острое повреждение почек), заболевание периферических сосудов и серповидно-клеточная анемия (синдром острого поражения грудной клетки, острое поражение почек). Основные хирургические операции могут быть связаны с И/Р-повреждением, включая хирургическую операцию на сердце (в случае острой сердечной недостаточности после кардиопульмонарного шунтирования), хирургическую операцию на грудной клетке (в случае острой легочной недостаточности), хирургическую операцию на периферических сосудах (в случае синдрома компартмента), сосудистую хирургию (в случае острой почечной недостаточности) и трансплантацию твердых органов (в случае острого отторжения трансплантата). В настоящее время какого-либо конкретного способа лечения И/Р-повреждения не существует, а поэтому необходимо разработать эффективные способы лечения для максимального сохранения ткани в ишемической зоне и улучшения функциональных результатов при проведении таких общих процедур.

Патофизиология И/Р-повреждений является сложной и характеризуется стойким воспалительным ответом на реперфузию. Активация системы комплемента участвует в качестве важного компонента И/Р-повреждения, и ингибирование активности комплемента было эффективным у животных с различными моделями этой патологии (Diepenhorst G.M.P. et al., *Ann. Surg.* 249:889-899, 2009). Относительная важность классического, лектинового и альтернативных путей в И/Р-повреждении остается спорной и может отличаться в зависимости от пораженных органов. В последнее время, создание нокаут-мышей с дефицитом специфических белков комплемента и специфических ингибиторов конкретного пути позволило получить данные об участии лектинового и альтернативного пути в И/Р-повреждении.

Роль альтернативного пути в И/Р-повреждении желудочно-кишечного тракта исследовали с использованием дефицитных по фактору D(-/-) и гетерозиготных (+/-) мышей (Stahl G.L. et al. *Am. J. Pathol.* 162:449-455, 2003). После кратковременной ишемии желудочно-кишечного тракта, кишечное и легочное повреждение были уменьшены, но не предотвращены у мышей с дефицитом фактора D по сравнению с гетерозиготными мышами, и добавление человеческого фактора D мышам с дефицитом фактора D (-/-) приводило к восстановлению И/Р-повреждения. Такая же модель была оценена у C1q-дефицитных и MBL-A/C-дефицитных мышей, и результаты показали, что желудочно-кишечное И/Р-повреждение не зависело от C1q и активации классического пути, но MBL и активация лектинового пути всегда приво-

дили к повреждению кишечника (Hart M.L. et al. *J. Immunol.* 174:6373-6380, 2005). С другой стороны, молекула распознавания C1q-классического пути была ответственна за повреждение легких после И/Р-повреждения кишечника (Hart M.L. et al. *J. Immunol.* 174:6373-6380, 2005). Одна из гипотез состоит в том, что активация комплемента во время И/Р-повреждения происходит благодаря связыванию природного IgM с аутоантигенами, присутствующими на поверхности ишемической (но не нормальной) ткани, например тяжелых цепей немышечного миозина типа II. В мышинной модели желудочно-кишечного И/Р-повреждения, иммунокомплексы ткани кишечника оценивали на наличие инициирующих факторов классического (C1q), лектинового (MBL) или альтернативного (фактор В) путей (Lee H. et al., *Mol. Immunol.* 47:972-981, 2010). Результаты показали, что C1q и MBL были обнаружены, а фактор В не был обнаружен в этих иммунокомплексах, что указывает на то, что они участвуют в классическом и лектиновом путях, но не в альтернативном пути. В той же модели, мыши с дефицитом фактора В не были защищены от локального повреждения тканей, что дополнительно подтверждало отсутствие участия фактора В в альтернативном пути. Роль лектинового пути в желудочно-кишечном И/Р-повреждении непосредственно оценивали у MASP-2-дефицитных мышей, и результаты показали, что желудочно-кишечное И/Р-повреждение у этих мышей было снижено по сравнению с контролем дикого типа, а обработка моноклональным антителом анти-MASP-2 антителом давала аналогичный протективный эффект (Schwaebble W.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011). В целом, эти результаты подтвердили участие лектинового пути в желудочно-кишечном И/Р-повреждении, что противоречит данным относительно участия альтернативного пути.

В мышинной модели И/Р-повреждения миокарда патогенная роль была продемонстрирована для лектинового пути, поскольку у MBL-дефицитных мышей наблюдалась защита от повреждения миокарда, тогда как у C1q-дефицитных и у C2/Fb-дефицитных мышей такая защита отсутствовала (Walsh M.C. et al., *J. Immunol.* 175:541-546, 2005). Защита от И/Р-повреждений миокарда также наблюдалась у MASP-2-дефицитных мышей (Schwaebble W.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011). Обработка крыс с моделью И/Р-повреждения миокарда моноклональными антителами против крысиного MBL приводило к снижению постишемического реперфузионного повреждения (Jordan J.E. et al., *Circulation* 104:1413-18, 2001). При обследовании пациентов с инфарктом миокарда, которым была проведена ангиопластика, дефицит MBL был ассоциирован со снижением смертности через 90 дней по сравнению с пациентами, у которых наблюдалось достаточное количество MBL (M. Trendelenburg et al., *Eur. Heart J.* 31:1181, 2010). Кроме того, у пациентов с инфарктом миокарда, у которых развивалась сердечная недостаточность после ангиопластики, уровни MBL были приблизительно в три раза выше, чем у пациентов, прошедших функциональную восстановительную терапию (Haahr-Pedersen S. et al., *J. Inv. Cardiology*, 21:13, 2009). Анти-MBL антитела также снижали уровень осаждения комплемента на эндотелиальных клетках *in vitro* после окислительного стресса, что указывает на роль лектинового пути в И/Р-повреждении миокарда (Collard, C.D. et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-56, 2000). У мышинной модели гетеротопного изотрансплантата сердца с И/Р-повреждением, роль альтернативного пути была исследована с использованием путь-специфического гибридного белка CR2-fH (Atkinson C. et al., *J. Immunol.* 185:7007-7013, 2010). Системное введение CR2-fH сразу после трансплантации приводило к снижению И/Р-повреждения миокарда до уровня, сравнимого с уровнем, наблюдаемым после лечения CR2-Crfg, который ингибирует все пути комплемента, что указывает на ключевую роль альтернативного пути у этой модели.

В мышинной модели И/Р-повреждения почек участвует альтернативный путь, поскольку мыши с дефицитом фактора В были защищены от снижения функции почек и повреждения канальцев по сравнению с мышами дикого типа (Thurman J.M. et al., *J. Immunol.* 170:1517-1523, 2003). Обработка ингибирующим моноклональным антителом против фактора В предотвращало активацию комплемента и снижало степень И/Р-повреждения почек у мышей (Thurman J.M. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:707-715, 2006). В модели билатерального И/Р-повреждения почек, MBL-A/C-дефицитные мыши были защищены от повреждения почек по сравнению с мышами дикого типа, и рекомбинантный человеческий MBL отменял протективный эффект у MBL-A/C-дефицитных мышей, что указывало на роль MBL в этой модели (Moller-Kristensen M. et al., *Scand. J. Immunol.* 61:426-434, 2005). В крысиной модели одностороннего И/Р-повреждения почек, ингибирование MBL моноклональным антителом против MBL-A приводило к сохранению функции почек после И/Р (van der Pol P. et al., *Am. J. Transplant.* 12:877-887, 2010). Интересно отметить, что роль MBL в этой модели, очевидно, не связана с активацией терминальных компонентов комплемента, поскольку обработка анти-C5 антителом была неэффективной в предотвращении повреждения почек. Скорее всего, MBL оказывают прямое токсическое действие на клетки канальцев, поскольку инкубирование человеческих клеток проксимальных канальцев с MBL *in vitro* приводило к интернализации MBL в эти клетки с последующим их апоптозом. В свиной модели И/Р-повреждения почек, Castellano G. и др. (*Am J Pathol*, 176(4):1648-59, 2010) протестировали ингибитор C1, который необратимо инактивирует протеазы C1r и C1s в классическом пути, а также протеазы MASP-1 и MASP-2 в MBL-комплексах лектинового пути, и было обнаружено, что ингибитор C1 снижал степень осаждения комплемента в перитубулярных капиллярах и в клубочках и уменьшал степень повреждения канальцев.

Альтернативный путь, очевидно, участвует в экспериментальном травматическом повреждении головного мозга, поскольку у мышей с дефицитом фактора В наблюдалось снижение системной активации

комплемента, определяемой в сыворотке по уровням C5a, и снижение посттравматической гибели нейронов по сравнению с мышами дикого типа (Leinhase I. et al., BMC Neurosci. 7:55-67, 2006). В случае инсульта у человека компоненты C1q, C3c и C4d комплемента были обнаружены посредством иммуногистохимического окрашивания в области ишемических повреждений, что, предположительно, указывало на активацию по классическому пути (Pedersen E.D. et al., Scand. J. Immunol. 69:555-562, 2009). Нацеливание на классический путь у животных с моделью ишемии головного мозга дало неоднозначные результаты, причем, некоторые исследования продемонстрировали защиту, в то время как другие не давали никакого эффекта (Arumugam T.V. et al., Neuroscience 158:1074-1089, 2009). Экспериментальные и клинические исследования давали убедительные доказательства участия лектинового пути. В экспериментальных моделях инсульта дефицит MBL или MASP-2 приводил к уменьшению размеров инфаркта по сравнению с мышами дикого типа (Cervera A. et al., PLoS One 3;5(2): e8433, 2010; Osthoff M. et al., PLoS One, 6(6):e21338, 2011). Кроме того, пациенты с инсультом, у которых были обнаружены низкие уровни MBL, имели лучший прогноз по сравнению с пациентами, у которых уровни MBL были в норме (Osthoff M. et al., PLoS One, 6(6):e21338, 2011).

У павианов с моделью экстракорпорального кровообращения обработка моноклональным антителом против фактора D приводила к ингибированию системного воспаления, как было определено по уровням C3a, SC5b-9 и IL-6 в плазме, и к снижению повреждения ткани миокарда, что указывало на участие альтернативного пути у этой модели (Undar A. et al., Ann. Thorac. Surg. 74:355-362, 2002).

Таким образом, в зависимости от И/Р-поврежденного органа все три пути комплемента могут вносить свой вклад в патогенез и неблагоприятный исход. На основании экспериментальных и клинических данных, подробно описанных выше, было высказано предположение, что ингибиторы LEA-2 будут давать протективный эффект в большинстве случаев И/Р-повреждения. Лектин-зависимая активация LEA-1 может вызывать активацию комплемента по альтернативному пути по меньшей мере в некоторых случаях. Кроме того, LEA-2-инициированная активация комплемента может дополнительно усиливаться за счет петли амплификации альтернативного пути и таким образом обострять И/Р-ассоциированное повреждение ткани. Таким образом, было высказано предположение, что ингибиторы LEA-1 дают результаты при аддитивной или адьювантной терапии у пациентов, страдающих состоянием, ассоциированным с ишемией.

С учетом указанного выше предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 имеют независимые терапевтические преимущества в лечении, профилактике или ослаблении тяжести состояний, ассоциированных с ишемией и реперфузией. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента. Следовательно, оптимально эффективное лечение И/Р-ассоциированного состояния включает введение активных фармацевтических ингредиентов, которые, отдельно или в комбинации, блокируют LEA-1 и LEA-2. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть достигнуто путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Предпочтительно, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести ишемическо-реперфузионных повреждений путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе индивидууму, страдающему ишемической реперфузией. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму внутриаартериально, внутривенно, интракраниально, внутримышечно, подкожно или другим способом парентерального введения, и, возможно, перорально, для не-пептидергических ингибиторов, а наиболее предпочтительно, внутриаартериально или внутривенно. Введение LEA-1-ингибирующих композиций согласно изобретению обычно начинают сразу после события ишемической реперфузии или, по возможности, вскоре после такого события. В случаях, когда реперфузия происходит в контролируемой среде (например, после репарации аневризмы аорты, трансплантации органов или реплантации пораженных или травмированных конечностей или пальцев), LEA-1-ингибирующий агент может быть введен до, и/или во время, и/или после реперфузии. Введение может периодически повторяться в соответствии с назначением врача до достижения оптимального терапевтического эффекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные способы применяют для лечения или профилактики ишемическо-реперфузионного повреждения, ассоциированного по меньшей мере с репарацией аневризмы аорты, искусственным кровообращением, васкулярным реанастомозом в связи с трансплантацией органов и/или реплантацией конечностей/пальцев, инсультом, инфарктом миокарда и гемодинамической реанимацией после инсульта и/или хирургических операций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные способы применяют для лечения

или профилактики ишемическо-реперфузионного повреждения у индивидуума, которому необходима трансплантация органов, у индивидуума, которому проводят трансплантацию органов, или у индивидуума, которому уже была проведена трансплантация органов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанные способы применяют для лечения или профилактики ишемическо-реперфузионного повреждения у индивидуума, которому необходима трансплантация органов, которому проводят трансплантацию органов, или которому уже была проведена трансплантация органов, при условии, что трансплантируемым органом не является почечный трансплантат.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ согласно этому аспекту изобретения дополнительно включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента у индивидуума, страдающего ишемической реперфузией, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести ишемическо-реперфузионных повреждений по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму, нуждающемуся в этом, внутриаартериально, внутривенно, интракраниально, внутримышечно, подкожно или другим способом парентерального введения, и, возможно, перорально, для не-пептидергических ингибиторов, а наиболее предпочтительно, внутриаартериально или внутривенно. Введение MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению обычно начинают сразу после события ишемической реперфузии или, по возможности, вскоре после такого события. В случаях, когда реперфузия происходит в контролируемой среде (например, после репарации аневризмы аорты, трансплантации органов или реплантации пораженных или травмированных конечностей или пальцев), MASP-2-ингибирующий агент может быть введен до, и/или во время, и/или после реперфузии. Введение может периодически повторяться в соответствии с назначением врача до достижения оптимального терапевтического эффекта.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и, необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты, или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения или профилактики ишемическо-реперфузионных повреждений.

Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, страдающего ишемической реперфузией.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, например, у индивидуума, страдающего ишемической реперфузией.

В соответствии с этим в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего ишемической реперфузией, или индивидуума с риском развития ишемической реперфузии, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития поражения ткани, ассоциированного с ишемической реперфузией у индивидуума.

D. Роль MASP-3 в развитии воспалительного и невоспалительного артрита и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание суставов,

которое также может иметь системные манифестации. РА страдает приблизительно 1% населения всего мира, причем у женщин вероятность развития такого заболевания в два-три раза больше. Воспаление суставов проявляется в виде отека, боли и тугоподвижности. По мере прогрессирования заболевания может наблюдаться эрозия и разрушение сустава, что приводит к ограничению подвижности и к деформациям. Целью лечения РА является предотвращение или устранение повреждения сустава, предотвращение потери функции сустава и прогрессирования заболевания, а также ослабление симптомов, улучшение качества жизни и достижение ремиссии без лекарственных средств. Фармакологическое лечение РА включает введение болезнь-модифицирующих противоревматических средств (DMARD), анальгетиков и противовоспалительных средств (глюкокортикоидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств). DMARD являются наиболее важными средствами для лечения, поскольку они могут давать длительные ремиссии и отсрочку или прекращение прогрессирования разрушения суставов, которое является необратимым. Традиционными DMARD являются небольшие молекулы, такие как метотрексат, сульфасалазин, гидроксихлорохин, соли золота, лефлуномид, D-пеницилламин, циклоспорин и азатиоприн. Если традиционные DMARD являются недостаточными для борьбы с этим заболеванием, то могут быть использованы некоторые биологические средства, нацеленные на воспалительные клетки или медиаторы воспаления, например ингибиторы фактора некроза опухоли (этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб-пегол и голимумаб), антагонисты цитокинов (анакинра и тоцилизумаб), ритуксимаб и абатацепт.

Хотя очевидно, что адаптивный иммунитет играет центральную роль в патогенезе РА, о чем свидетельствует генетическое сцепление с генами активации Т-клеток и присутствие аутоантител, однако, в таком патогенезе также участвуют природные иммунные механизмы (McInnes I.B. and Schett G. *New Engl. J. Med.* 365:2205-2219, 2011). При РА у человека, уровни расщепления фрагмента Bb альтернативного пути в синовиальной жидкости были в несколько раз выше, чем уровни в образцах, взятых у пациентов с артритом, индуцированным кристаллами, или с дегенеративным заболеванием суставов, что указывает на преимущественную активацию альтернативного пути у пациентов с РА (Brodeur J.P. et al., *Arthritis Rheum.* 34:1531-1537, 1991). В экспериментальной модели артрита, созданной путем пассивного переноса антитела против коллагена типа II, у мышей с дефицитом фактора В наблюдалось снижение воспаления и повреждения суставов по сравнению с мышами дикого типа, тогда как у C4-дефицитных мышей активность заболевания была аналогична активности заболевания у мышей дикого типа, что указывает на то, что в этой модели важную роль играет альтернативный, а не классический путь (Banda N.K. et al., *J. Immunol.* 177:1904-1912, 2006). В той же экспериментальной модели артрита, индуцированного антителом против коллагена (CAIA), у мышей с активностью только классического пути или только лектинового пути артрит не развивался (Banda N.K. et al., *Clin. Exp. Immunol.* 159:100-108, 2010). Данные этого исследования показали, что классический или лектиновый пути способны активировать низкие уровни C3 *in vitro*. Однако в отсутствии петли амплификации альтернативного пути уровень отложения C3 в суставе был недостаточным для развития клинического заболевания. Ключевой стадией в активации альтернативного пути является превращение зимогена фактора D (про-фактора D) в зрелый фактор D, которое опосредуется MASP-1 и/или MASP-3 (Takahashi M. et al., *J. Exp. Med.* 207:29-37, 2010) и/или HTRA1 (Stanton et al., Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration, presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011 conference on May 4, 2011). Роль MASP-1/3 была оценена в мышинном CAIA, и результаты показали, что MASP-1/3-дефицитные мыши были защищены от артрита по сравнению с мышами дикого типа (Banda N.K. et al., *J. Immunol.* 185:5598-5606, 2010). У MASP-1/3-дефицитных мышей, про-фактор D, но не зрелый фактор D, был обнаружен в сыворотке крови во время развития CAIA, и добавление в сыворотку этих мышей человеческого фактора D *in vitro* приводило к восстановлению активации C3 и генерации C5a. В противоположность этому, в мышинной модели эффекторной фазы артрита, у C3-дефицитных мышей развивался артрит в очень легкой форме по сравнению с мышами дикого типа, а у мышей с дефицитом фактора В, артрит продолжал развиваться, что указывало на независимое участие классического/лектинового пути и альтернативного пути (Hietala M.A. et al., *Eur. J. Immunol.* 34:1208-1216, 2004). У трансгенных мышей с моделью воспалительного артрита, индуцированного Т-клеточным рецептором K/B $\times$ N, и у мышей с отсутствием C4 или C1q наблюдался артрит, подобный артриту у мышей дикого типа, тогда как у мышей, не имеющих фактора В, артрит либо не развивался, либо развивался в очень легкой форме, что указывало на важную роль альтернативного пути, но не классического пути, в этой модели (Ji H. et al., *Immunity* 16:157-168, 2002). В модели K/B $\times$ N, мыши без MBL-A не были защищены от артрита, индуцированного сывороткой, но поскольку роль MBL-C пока еще не была исследована, то возможная роль лектинового пути не может быть исключена (Ji et al., 2002, см. выше).

Две группы исследователей независимо друг от друга высказали предположение, что лектин-зависимая активация комплемента вызывает воспаление у пациентов с РА посредством взаимодействия MBL со специфическими гликоформами IgG (Malhotra et al., *Nat. Med.* 1:237-243, 1995; Cuchacovich et al., *J. Rheumatol.* 23:44-51, 1996). Следует отметить, что ревматоидные состояния ассоциируются с заметным увеличением уровней гликоформ IgG, которые не содержат галактозу (упоминаются как гликоформы

IgG0) в Fc-области молекулы (Rudd et al., Trends Biotechnology 22:524 30, 2004). Процент гликоформ IgG0 возрастает по мере прогрессирования ревматоидного заболевания и возвращается к нормальному уровню, когда у пациентов наблюдается ремиссия. In vivo, IgG0 осаждается на синовиальной ткани, а MBL присутствует на повышенном уровне в синовиальной жидкости у пациентов с РА. Агрегированный агалактозил-IgG (IgG0), который ассоциируется с РА, может связываться с MBL, и, следовательно, может инициировать лектин-зависимую активацию комплемента посредством LEA-1 и/или LEA-2. Кроме того, результаты клинического исследования, проводимого для поиска аллельных вариантов MBL у пациентов с РА, позволяют предположить, что MBL может играть определенную роль в усилении воспалительного заболевания (Garred et al., J. Rheumatol. 27:26 34, 2000). Следовательно, лектин-зависимая активация комплемента посредством LEA-1 и/или LEA-2 может играть важную роль в патогенезе РА.

Активация комплемента также играет важную роль в развитии ювенильного ревматоидного артрита ((Mollnes, T.E. et al., Arthritis Rheum. 29:1359 64, 1986). Подобно ревматоидному артриту у взрослых, при ювенильном ревматоидном артрите, уровни продукта активации комплемента Вb альтернативного пути в сыворотке и в синовиальной жидкости возрастают по сравнению с уровнем C4d (маркера активации классического пути или LEA-2), что указывает на то, что активация комплемента опосредуется преимущественно LEA-1 (El Ghobarey A.F. et al., J. Rheumatology 7:453 460, 1980; Agarwal A. et al., Rheumatology 39:189 192, 2000).

Аналогичным образом, активация комплемента играет важную роль в развитии псориатического артрита. У пациентов с этим заболеванием наблюдается повышение уровней продуктов активации комплемента в кровотоке, и появляются эритроциты с более низкими уровнями регулятора CD59 комплемента (Triolo, Clin Exp Rheumatol., 21(2):225-8, 2003). Уровни комплемента ассоциируются с активностью заболевания и имеют высокую прогностическую ценность для определения исхода лечения (Chimenti et al., Clin. Exp. Rheumatol., 30(1):23-30, 2012). Действительно, недавние исследования показали, что эффект терапии этого состояния анти-TNF антителом объясняется модуляцией комплемента (Ballanti et al., Autoimmun Rev., 10(10):617-23, 2011). Хотя роль комплемента в развитии псориатического артрита не была точно определена, однако, наличие продуктов активации C4d и Bb комплемента в кровотоке этих пациентов указывает на их важную роль в патогенезе. Исходя из наблюдаемых продуктов, предполагается, что LEA-1, и также, возможно, LEA-2 ответственны за патологическую активацию комплемента у этих пациентов.

Остеоартрит (ОА) является наиболее распространенной формой артрита, которой страдают более 25 миллионов человек в Соединенных Штатах. ОА характеризуется разрушением и полной потерей суставного хряща и сопровождается образованием новой костной ткани и накоплением синовиальной жидкости, что вызывает боли, тугоподвижность и потерю функции сустава и приводит к инвалидности. Суставами, которые часто подвергаются ОА, являются суставы рук, шеи, поясницы, коленей и бедер. Эта болезнь является прогрессирующей, и современные методы лечения направлены на ослабление симптоматической боли, но не устраняют причины заболевания. Патогенез ОА остается пока неясным, но в этом патогенезе не исключена роль комплемента. При проведении протеомного и транскриптомного анализов синовиальной жидкости у пациентов с ОА некоторые компоненты комплемента аномально экспрессировались по сравнению с образцами, взятыми у здоровых индивидуумов, включая классический путь (C1s и C4A) и альтернативный путь (фактор В), а также C3, C5, C7 и C9 (Wang, Q. et al., Nat. Med. 17:1674-1679, 2011). Кроме того, в мышинной модели ОА, индуцированной медиальной менискоэктомией, у C5-дефицитных мышей наблюдалась меньшая потеря хряща, меньшее образование остеофитов и менее выраженный синовит, чем у C5-позитивных мышей, а обработка мышей дикого типа CR2-fH, т.е. гибридным белком, который ингибирует альтернативный путь, приводила к ослаблению развития ОА (Wang et al., 2011, см. выше).

Вирус реки Росс (RRV) и вирус Чикунгунья (CHIKV) принадлежат к группе вирусов комаров, которые могут вызвать острый и стойкий артрит и миозит у человека. Помимо эндемического заболевания, эти вирусы могут вызвать эпидемии, в которые могут быть вовлечены миллионы инфицированных людей. Считается, что артрит инициируется вирусной репликацией, а ключевыми компонентами такого процесса являются индуцирование воспалительного ответа в суставе у хозяина и активация системы комплемента. Синовиальная жидкость человека с RRV-индуцированным полиартритом содержит более высокие уровни C3a, чем синовиальная жидкость человека с ОА (Morrison T.E. et al., J. Virol. 81:5132-5143, 2007). В мышинной модели RRV-инфекции, у C3-дефицитных мышей наблюдался менее тяжелый артрит, чем у мышей дикого типа, что указывает на роль комплемента в этом заболевании (Morrison et al., 2007, см. выше). Было исследовано участие специфического пути комплемента, и было обнаружено, что у мышей с инактивированным лектиновым путем (MBL-A-/- и MBL-C-/-), артрит имел более слабую форму по сравнению с мышами дикого типа. В противоположность этому у мышей с инактивированным классическим путем (C1q-/-) или альтернативным путем (фактор В-/-) развивался тяжелый артрит, что указывало на то, что лектиновый путь, инициированный MBL, играл существенную роль в этой модели (Gunn B.M. et al., PLoS Pathog. 8:e1002586, 2012). Поскольку артрит ассоциируется с повреждением суставов, то первоначальные повреждения суставов, имеющие различную этиологию, могут запускать вторую волну активации комплемента посредством LEA-2. В поддержку этой концепции, авторы отмечают,

что предыдущая их работа показала, что у мышей с нокаутом MASP-2 наблюдалось уменьшение повреждения суставов по сравнению с мышами дикого типа в модели индуцированного коллагеном РА.

Исходя из данных, подробно описанных выше, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2, взятые отдельно или в комбинации, являются терапевтически эффективными для лечения артритов.

Следовательно, оптимально эффективное лечение артритов может включать введение активных фармацевтических ингредиентов, которые, отдельно или в комбинации, блокируют LEA-1 и LEA-2. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть достигнуто путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Предпочтительно, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки. В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести воспалительных или невоспалительных артритов, включая остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит и псориатический артрит, путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему воспалительным или невоспалительным артритом, или индивидууму с риском развития такого артрита. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, подкожно или другим способом парентерального введения, или перорально. Альтернативно, введение может быть осуществлено местно, например путем внутрисуставной инъекции. Введение LEA-1-ингибирующего агента может быть осуществлено периодически в течение длительного периода времени для лечения или устранения хронического состояния, либо оно может быть осуществлено один раз или более раз до, во время и/или после тяжелой травмы или повреждения, включая хирургические операции на суставах.

В одном из вариантов осуществления изобретения, способ согласно этому аспекту изобретения дополнительно включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента у индивидуума, страдающего воспалительным или невоспалительным артритом (включая остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит и псориатический артрит), или у индивидуума с риском развития такого артрита, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат при лечении или профилактике артрита по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму, нуждающемуся в этом, системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, перорально, для не-пептидергических ингибиторов. Альтернативно, введение может быть осуществлено местно, например путем внутрисуставной инъекции. Введение MASP-2-ингибирующего агента может быть осуществлено периодически в течение длительного периода времени для лечения или устранения хронического состояния, либо оно может быть осуществлено один раз или более раз до, во время и/или после тяжелой травмы или повреждения, включая хирургические операции на суставах.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и, необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты, или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести воспалительных или невоспалительных артритов. Альтернативно, композиция может быть введена пе-

риодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, страдающего воспалительным или невоспалительным артритом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как артрит.

В соответствии с этим в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего артритом, или индивидуума с риском развития артрита (воспалительного и невоспалительного артрита), где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, в целях лечения или снижения риска развития артрита у индивидуума, где, например, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариательную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариательную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум страдает артритом, выбранным из группы, состоящей из остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Бехчета, артрита, вызываемого инфекцией, и псориатического артрита. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят системно (т.е., подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально или в виде ингаляции). В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят местно в сустав.

Е. Роль MASP-3 в развитии диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВСК) и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС) представляет собой синдром патологической гиперстимуляции системы свертывания крови, который может клинически проявляться как кровоизлияние и/или тромбоз. ДВС не развивается как первичное состояние, а обычно ассоциируется с различными патологическими процессами, включая повреждение тканей (травму, ожоги, тепловой удар, трансфузионную реакцию, острое отторжение трансплантата), неоплазии, инфекции, осложнения при родах (предлежание плаценты, эмболию амниотической жидкости, токсикоз беременности), а также различные смешанные состояния, такие как кардиогенный шок, повреждение легких при несчастных случаях на воде, жировая эмболия, аневризма аорты. Тромбоцитопения является патологией, которая часто встречается у пациентов в Отделении интенсивной терапии, с частотой от 35 до 44%, а приблизительно в 25% этих случаев, она является этиологическим фактором ДВС, т.е. ДВС развивается приблизительно у 10% больных в критическом состоянии (Levi M. and Opal S.M. Crit. Care 10:222-231, 2006). Патология ДВС представляет собой патологический процесс, в основе которого лежит инициация физиологической реакции свертывания крови. Однако протромботические вещества подавляют нормальные механизмы уравнивания таким образом, что в этом случае происходит неправильное осаждение фибрина и тромбоцитов в капиллярном кровотоке, что приводит к ишемии органа, гипофибриногенемии и тромбоцитопении. Диагностика ДВС основывается на клинической картине, соответствующей основному заболеванию или патологическому процессу, наряду с отклонениями в лабораторных параметрах (таких как протромбиновое время, частичное тромбопластиновое время, продукты разложения фибрина, наличие D-димеров или количество тромбоцитов). Лечение ДВС первого ряда заключается в предотвращении основного состояния, которое является ответственным за развитие ДВС. Для лечения или профилактики клинических осложнений может оказаться необходимым поддержание компонентов крови в форме эритроцитов, тромбоцитов, свежзамороженной плазмы и криопреципитата.

Роль путей комплемента в развитии ДВС была изучена в нескольких исследованиях. Активацию комплемента оценивали у детей с менингококковой инфекцией путем сравнения клинического течения болезни по MBL-генотипу (Sprong T. et al., Clin. Infect. Dis. 49:1380-1386, 2009). При поступлении в клинику, у пациентов с дефицитом MBL наблюдались более низкие уровни C3bc, терминального комплекса комплемента, C4bc и C3bBbC3bBbP, в кровотоке, чем у пациентов с достаточным уровнем MBL, что указывает на более низкую степень общего комплемента, терминального комплемента и активации альтернативного пути. Кроме того, степень системной активации комплемента коррелирует с тяжестью заболевания и с параметрами ДВС, и у MBL-дефицитных пациентов наблюдалось более слабое течение болезни, чем у пациентов с достаточным уровнем MBL. Поэтому, хотя дефицит MBL является фактором риска для пациентов, восприимчивых к инфекции, однако, дефицит MBL во время септического шока может ассоциироваться со снижением тяжести заболевания.

Как показано здесь в примерах 1-4, экспериментальные исследования выявили важный вклад MBL и MASP-1/3 во врожденный иммунный ответ на *Neisseria meningitidis*, т.е. этиологический фактор менин-

гококковой инфекции. MBL-дефицитная сыворотка, взятая у мышей или у людей, MASP-3-дефицитная человеческая сыворотка или сыворотка мышей с MASP-1/3-нокаутом были менее эффективны в отношении активации комплемента и лизиса менингококков *in vitro* по сравнению с сывороткой дикого типа. Аналогичным образом, мыши с MASP-1/3-нокаутом, ранее не участвующие в экспериментах, были более восприимчивы к инфекции *Neisseria*, чем аналогичные мыши дикого типа. Таким образом, в отсутствие адаптивного иммунитета, путь LEA-1 вносит свой вклад в природную резистентность хозяина к инфекции *Neisseria*. И наоборот, LEA-1 усиливает патологическую активацию комплемента, запускающую нежелательный ответ у хозяина, включая ДВС.

В мышинной модели артериального тромбоза MBL-дефицитные мыши и мыши с MASP-1/3-нокаутом имели пониженный FeCl₃-индуцированный тромбогенез по сравнению с мышами дикого типа или с мышами, не имеющими C2/фактора В, и этот дефект был восстановлен с помощью рекомбинантного человеческого MBL (La Bonte L.R. et al., *J. Immunol.* 188:885-891, 2012). *In vitro*, сыворотка MBL-дефицитных мышей или мышей с MASP-1/3-нокаутом имела пониженные уровни расщепления субстрата тромбином по сравнению с сывороткой мышей дикого типа или мышей, не имеющих C2/фактора В, а добавление рекомбинантного человеческого MASP-1 приводило к восстановлению продукта расщепления субстрата тромбином в сыворотке мышей с MASP-1/3-нокаутом (La Bonte et al., 2012, см. выше). Эти результаты показали, что комплексы MBL/MASP, а в частности MASP-1, играют ключевую роль в образовании тромбов. Таким образом, LEA-1 может играть важную роль в патологическом тромбозе, включая ДВС.

Экспериментальные исследования выявили такую же важную роль LEA-2 в патологическом тромбозе. *In vitro* исследования также продемонстрировали, что LEA-2 обеспечивает молекулярную связь между системой комплемента и системой свертывания крови. MASP-2 обладает активностью, подобной активности фактора Ха, и активирует протромбин посредством расщепления с образованием тромбина, который может впоследствии выводить фибриноген и способствовать образованию фибринового сгустка (см. также Krarup et al., *PLoS One*, 18:2(7):e623, 2007).

Отдельные исследования показали, что комплексы лектин-MASP могут способствовать образованию сгустков, отложению фибрина и высвобождению фибринопептида по MASP-2-зависимому механизму (Gulla K.C. et al., *Immunology*, 129(4):482-95, 2010). Таким образом, LEA-2 стимулирует одновременно лектин-зависимую активацию комплемента и систему свертывания крови.

Исследования *in vitro* также показали, что MASP-1 обладает тромбин-подобной активностью (Pre-sanis J.S. et al., *Mol. Immunol.*, 40(13):921-9, 2004) и расщепляет фибриноген и фактор XIII (Gulla et al., *Immunology*, 129(4):482-95, 2010), что позволяет предположить, что LEA-1 может активировать пути свертывания крови независимо или в комбинации с LEA-2.

Данные, подробно описанные выше, позволяют предположить, что LEA-1 и LEA-2 обеспечивают независимую связь между лектин-зависимой активацией комплемента и свертыванием крови. Таким образом, с учетом приведенных выше данных, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 дают независимый терапевтический эффект при лечении индивидуума, страдающего диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум страдает диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, вызываемым сепсисом, травмой, инфекцией (бактериальной, вирусной, грибковой, паразитарной), злокачественной опухолью, отторжением трансплантата, реакцией на переливание крови, осложнением при родах, сосудистой аневризмой, печеночной недостаточностью, тепловым ударом, ожогом, радиоактивным облучением, инсультом или тяжелой токсической реакцией (например, укусом змеи, укусом насекомого, реакцией на переливание крови). В некоторых вариантах осуществления изобретения травмой является неврологическая травма. В некоторых вариантах осуществления изобретения, инфекцией является бактериальная инфекция, такая как инфекция, вызываемая *Neisseria meningitidis*.

Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента. Поскольку известно, что LEA-1 и LEA-2 активируются в условиях, приводящих к ДВС (например, к инфекции или травме), то предполагается, что LEA-1-и LEA-2-блокирующие агенты, либо по отдельности, либо в комбинации, должны давать терапевтический эффект при лечении ДВС. LEA-1- и LEA-2-блокирующие агенты могут блокировать различные механизмы перекрестного взаимодействия между реакцией комплемента и свертывания крови. Таким образом, LEA-1- и LEA-2-блокирующие агенты могут давать комплементарный, аддитивный или синергический эффект в предотвращении ДВС и других тромботических нарушений.

Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента, либо они могут давать эффект при лечении большого числа подгрупп пациентов. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть достигнуто путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать, но необязательно, одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови или индивидууму с риском развития такого заболевания. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неперпидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано. Для лечения или профилактики ДВС, вызываемого травмой или другим повреждением, LEA-1-ингибирующая композиция может быть введена непосредственно после травматического повреждения или профилактически до, во время, сразу после или через 1-7 дней или более, например через 24-72 ч после травмы, вызывающей повреждение, или другой ситуации, такой, как хирургическая операция у пациентов с риском развития ДВС. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1-ингибирующая композиция может быть соответствующим образом введена в виде быстродействующей лекарственной формы, например путем внутривенной или внутриаартериальной доставки ударной дозы раствора, содержащего композицию LEA-1-ингибирующего агента.

В одном из вариантов осуществления изобретения, способ согласно этому аспекту изобретения также включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP1/3-ингибирующего агента индивидууму. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат при лечении или профилактике диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму, нуждающемуся в этом, системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неперпидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано. Для лечения ДВС, вызываемого травмой или другим повреждением, MASP-2-ингибирующая композиция может быть введена непосредственно после травматического повреждения или профилактически до, во время, сразу после или через 1-7 дней или более, например через 24-72 ч после травмы, вызывающей повреждение, или другого события, такого как хирургическая операция у пациентов с риском развития ДВС. В некоторых вариантах осуществления изобретения MASP-2-ингибирующая композиция может быть соответствующим образом введена в виде быстродействующей лекарственной формы, например путем внутривенной или внутриаартериальной доставки ударной дозы раствора, содержащего композицию MASP-2-ингибирующего агента.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и, необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты, или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного

периода времени для лечения индивидуума, страдающего диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, или индивидуума с риском развития такого заболевания.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, или индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, например, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

Ф. Роль MASP-3 в развитии тромботической микроангиопатии (ТМА), включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (АГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Тромботическая микроангиопатия (ТМА) относится к группе расстройств, характеризующихся клинической тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией и ишемией различных органов. Характерными патологическими признаками ТМА являются активация тромбоцитов и образование микротромбов в небольших артериолах и венах. Классическими ТМА являются гемолитический уремический синдром (ГУС) и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП). ГУС отличается от ТТП наличием острой почечной недостаточности. ГУС встречается в двух формах: ассоциированный с диареей (Д+) или типичный ГУС и не ассоциированный с диареей (Д-) или атипичный ГУС (аГУС).

ГУС.

Д+ГУС ассоциируется с продромальным заболеванием, сопровождающимся диареей и обычно вызываемым *Escherichia coli* 0157 или другим шига-токсин-продуцирующим штаммом бактерий, причем это заболевание в более чем 90% случаев встречается у детей и является наиболее распространенной причиной острой почечной недостаточности у детей. Хотя инфицирование *Escherichia coli* 0157 у человека происходит относительно часто, однако, в единичных случаях, процент кровавой диареи, которая прогрессирует и переходит в Д+ГУС, составляет от 3 до 7%, а при некоторых вспышках инфекции, она составляет от 20 до 30% (Zheng X.L. and Sadler J.E., *Annu. Rev. Pathol.* 3: 249-277, 2008). ГУС обычно проявляется через 4-6 дней после начала диареи, и приблизительно две трети детей с острой фазой заболевания нуждаются в диализе. Лечение Д+ГУС является поддерживающим, поскольку не существует каких-либо конкретных эффективных способов его лечения. Прогноз Д+ГУС является благоприятным, и у большинства пациентов, функция почек восстанавливается.

В патогенезе Д+ГУС участвуют продуцируемые бактериями шига-токсины, которые связываются с мембранами на микрососудистых эндотелиальных клетках, моноцитах и тромбоцитах. В большинстве случаев поражается микрососудистая система почек. После связывания токсин интернализуется, что приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов и, в конечном счете, гибели клеток. Считается, что повреждение эндотелиальных клеток вызывает тромбоз микрососудов почек посредством стимуляции активации каскада реакций свертывания крови. Существуют данные, указывающие на активацию системы комплемента при Д+ГУС. У детей с Д+ГУС, уровни В_h и SC5b-9 в плазме были увеличены в момент госпитализации по сравнению с нормальным контролем, и на 28-й день после выписки из стационара, уровни в плазме были в норме (Thurman J.M. et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4:1920-1924, 2009). Было обнаружено, что шига-токсин 2 (Stx2) активирует человеческий комплемент в жидкой фазе *in vitro*, в основном, посредством альтернативного пути по мере его активации в присутствии этиленгликолететрауксусной кислоты, которая блокирует классический путь (Orth D. et al., *J. Immunol.* 182:6394-6400, 2009). Кроме того, Stx2 связывается с фактором Н, но не с фактором I, и замедляет кофакторную активность фактора Н на поверхности клеток (Orth et al, 2009, *supra*). Эти результаты позволяют предположить, что шига-токсин может вызывать повреждение почек по множеству потенциальных механизмов, включая прямой токсический эффект и опосредованную активацию комплемента или ингибирование регуляторов комплемента. Предполагается, что токсическое воздействие на сосудистый эндотелий активирует комплемент посредством LEA-2, на что указывает эффективность блокады MASP-2 в предотвращении комплемент-опосредованного реперфузионного повреждения в различных васкулярных ложах, как описано у Schwaebler W.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011.

В мышинной модели ГУС, индуцированной путем комбинированной инъекции шига-токсина и ли-

пополисахарида, у мышей с дефицитом фактора В наблюдалась более слабая тромбоцитопения, и эти мыши были защищены от повреждения почек по сравнению с мышами дикого типа, что указывает на участие LEA-1-зависимой активации альтернативного пути в развитии микрососудистого тромбоза (Morigi M. et al., *J. Immunol.* 87:172-180, 2011). Как описано в настоящей заявке, в той же самой модели, введение анти-MASP-2 антитела также было эффективным и способствовало увеличению выживаемости после провокационного введения STX, что указывает на участие LEA-2-зависимого пути комплемента в развитии микрососудистого тромбоза.

Исходя из данных, описанных выше, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 являются терапевтически эффективными для лечения или профилактики ГУС. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента, либо они могут давать эффект при лечении большого числа подгрупп пациентов. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть достигнуто путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента.

Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

аГУС.

Атипичный ГУС является редким заболеванием, и по оценкам специалистов в Соединенных Штатах, этим заболеванием страдает 2 человека на миллион (Loirat C. and Fremieux-Bacchi V. *Orphanet J. Rare Dis.* 6:60-90, 2011). Атипичный ГУС может развиваться в любом возрасте, хотя у большинства пациентов он начинается еще в детстве. Атипичный ГУС является неоднородным: в некоторых случаях он является наследственным, в некоторых случаях повторяющимся, а некоторых случаях, он вызывается инфекционным заболеванием, обычно, заболеванием верхних дыхательных путей или гастроэнтеритом. аГУС обычно развивается внезапно, и большинству пациентов при поступлении в стационар требуется диализ. Приблизительно у 20% пациентов наблюдаются внепочечные манифестации, и такие манифестации могут включать повреждение центральной нервной системы, инфаркт миокарда, ишемическую гангрену дистальных органов или недостаточность многих органов. Лечение аГУС заключается в проведении поддерживающей терапии в целях устранения дисфункции органов, в инфузии плазмы или в плазмаферезе и введении экулизумаба, т.е. гуманизированного моноклонального антитела, которое нацелено на C5, и которое недавно было одобрено для использования в Соединенных Штатах и Евросоюзе. Прогноз при аГУС не так благоприятен, как при Д+ГУС, причем приблизительно в 25% случаев летальный исход наступает в острой фазе, а у большинства выживших пациентов развивается заболевание почек на терминальной стадии.

Атипичный ГУС характеризуется как болезнь, связанная с нарушением регуляции комплемента, и приблизительно у 50% пациентов имеются мутации в генах, кодирующих белки регуляции комплемента (Zheng and Sadler, 2008 см. выше). Большинство мутаций наблюдается в факторе Н (FH), а другими мутациями являются мутации мембранного белка кофактора (MCP), фактора I (FI), фактора В и С3. Функциональные исследования показали, что мутации в FH, MCP и FI приводят к потере функции и, следовательно, к усилению активации комплемента, тогда как мутации в факторе В ответственны за усиление функции. Эффекты этих мутаций преимущественно влияют на альтернативный путь. Эти генетические аномалии представляют собой факторы риска, и являются не единственной причиной заболевания, поскольку приблизительно 50% членов семей, которые несут мутацию, не страдают заболеванием до 45-летнего возраста (Loirat and Fremieux-Bacchi, 2011, см. выше).

Фактор Н представляет собой белок регуляции комплемента, который защищает ткань хозяина от воздействия альтернативного пути комплемента. FH регулирует петлю амплификации альтернативного пути по трем механизмам, а именно: кофактор для FI, который расщепляет C3b, ингибирует образование C3-конвертазы альтернативного пути, C3bBbC3bBb; связывается с полианионами на клеточных поверхностях и матриксах ткани; и блокирует осаждение C3b (Atkinson J.P. and Goodship T.H.J., *J. Exp. Med.* 6:1245-1248, 2007). Большинство мутаций FH у больного с аГУС встречается в С-концевых коротких консенсусных повторяющихся доменах белка, что приводит к дефектному связыванию FH с гепарином, C3b и эндотелием, но не нарушает регуляцию C3 в плазме, который находится между N-концевыми доменами (Pickering M.C. et al., *J. Exp. Med.* 204:1249-1256, 2007). У FH-дефицитных мышей наблюдается нерегулируемая активация C3 в плазме и спонтанно развивается мембранопролиферативный гломерулонефрит типа II, но не аГУС. Тем не менее, у FH-дефицитных мышей, у которых на трансгенном уровне экспрессируется мышинный белок FH, функционально эквивалентный человеческим мутантам FH, ассоциированным с аГУС, спонтанно развивается ГУС, но не мембранопролиферативный гломерулонефрит типа II, что подтверждается данными *in vivo*, указывающими на то, что нарушение регуляции активации альтернативного пути в почечном эндотелии является ключевым событием в патогенезе FH-ассоциированного аГУС (Pickering et al., 2007, см. выше). Другая форма FH-ассоциированного аГУС встречается у пациентов, у которых присутствуют анти-FH аутоантитела, приводящие к потере функциональной активности FH; и у большинства этих пациентов имеются делеции в генах, кодирующих пять FH-

родственных белков (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, см. выше).

Подобно FH, MCP ингибирует активацию комплемента посредством регуляции осаждения C3b на клетках-мишенях. Мутации MCP приводят к продуцированию белков с низкой C3b-связывающей и кофакторной аффинностью, что приводит к нарушению активации альтернативного пути. FI представляет собой сериновую протеазу, которая расщепляет C3b и C4b в присутствии кофакторов, таких как FH и MCP, и тем самым предотвращает образование C3- и C5-конвертаз и ингибирует как альтернативный, так и классический пути комплемента. Большинство FI-ассоциированных мутаций aГУС приводит к снижению активности FI в разложении C3b и C4b (Zheng and Stadler, 2008, см. выше). FB представляет собой зимоген, который несет каталитические сайты конвертазы C3bBbC3bBb альтернативного пути. Функциональный анализ показал, что aГУС-ассоциированные мутации FB приводят к повышению активации альтернативного пути (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, см. выше). Гетерозиготные мутации C3 ассоциируются с aГУС. Большинство мутаций C3 индуцируют нарушение связывания C3 с MCP, что приводит к увеличению эффективности связывания FB с C3b и к повышению уровня продуцирования C3-конвертазы (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, см. выше). Таким образом, aГУС представляет собой заболевание, тесно ассоциированное с мутациями в генах комплемента, которое приводит к неадекватной регуляции петли амплификации альтернативного пути. Поскольку петля амплификации альтернативного пути зависит от протеолитической активности фактора В, и поскольку LEA-1 необходима для активации фактора В (либо MASP-3-зависимого расщепления или расщепления, опосредованного фактором D, где MASP-1 вносит свой вклад в созревание фактора D), то предполагается, что LEA-1-блокирующие агенты будут предотвращать нерегулируемую активацию комплемента у чувствительных индивидуумов. В результате, предполагается, что LEA-1-блокирующие агенты будут эффективными для лечения aГУС.

Хотя центральная роль нарушения регуляции петли амплификации альтернативного пути в развитии aГУС широко известна, однако, стимулы, инициирующие активацию комплемента и молекулярные пути, участвующие в такой активации, пока еще не известны. Однако aГУС развивается не у всех людей, несущих вышеописанные мутации. Действительно, семейный анамнез показал, что aГУС встречается только в ~50% случаев (Sullivan M. et al., *Ann. Hum. Genet.* 74:17-26 2010). Патогенез заболевания указывает на то, что aГУС чаще всего развивается после события инициации, такого как инфекционная вспышка или травма. Хорошо известно, что инфекционные агенты активируют систему комплемента. В отсутствие уже существующего адаптивного иммунитета, активация комплемента инфекционными агентами может инициироваться, главным образом, LEA-1 или LEA-2. Таким образом, лектин-зависимая активация комплемента, инициируемая инфекцией, может служить инициирующим стимулом для последующей патологической амплификации активации комплемента у индивидуумов с предрасположенностью к aГУС, что, в конечном счете, может приводить к прогрессированию заболевания. В соответствии с этим, в другом своем аспекте, настоящее изобретение включает лечение пациента, страдающего aГУС, вызываемым инфекцией, путем введения эффективного количества LEA-1- или LEA-2-ингибирующего агента.

Другие формы повреждения ткани хозяина будут активировать комплемент посредством LEA-2, в частности, будут вызывать повреждение сосудистого эндотелия. Человеческие эндотелиальные клетки сосудов подвергаются окислительному стрессу, например реагируют на экспрессию поверхностных молекул, которые связываются с лектинами и активируют путь LEA-2 комплемента (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 156(5):1549-56, 2000). Повреждения сосудов после ишемии/реперфузии также активируют комплемент посредством LEA-2 in vivo (Moller-Kristensen et al., *Scand. J. Immunol.* 61(5):426-34, 2005). Активация лектинового пути в этой ситуации имеет патологические последствия для хозяина, и, как показано в примерах 22 и 23, ингибирование LEA-2 посредством блокирования MASP-2 предотвращает дальнейшее повреждение ткани хозяина и неблагоприятные исходы (см. также Schwaebler PNAS, 2011, выше).

Таким образом, также известно, что другие процессы, которые вызывают aГУС, приводят к активации LEA-1 или LEA-2. Поэтому вполне вероятно, что LEA-1- и/или LEA-2-путь может представлять собой первоначальный механизм активации комплемента, который неадекватно амплифицируется по механизму нарушения регуляции у индивидуумов с генетической предрасположенностью к aГУС, и таким образом, инициирует патогенез aГУС. Из этого можно сделать вывод, что агенты, которые блокируют активацию комплемента посредством LEA-1 и/или LEA-2, как и предполагается, будут предотвращать прогрессирование заболевания или снижать степень его обострения у индивидуумов, восприимчивых к aГУС.

В целях дальнейшего подтверждения этой концепции недавно были проведены исследования, которые показали, что бактерия *Streptococcus pneumoniae* представляет собой важный этиологический агент, участвующий в развитии aГУС у детей (Lee C.S. et al. *Nephrology*, 17(1):48-52 (2012); Banerjee R. et al., *Pediatr Infect Dis J.*, 30(9):736-9 (2011)). Заболевание такой этиологии, как считается, имеет неблагоприятный прогноз с высокой смертностью и хроническими осложнениями. Примечательно, что эти случаи относятся к не-кишечным инфекциям, приводящим к манифестациям микроангиопатии, уремии и гемолиза без признаков параллельных мутаций в генах комплемента, которые, как известно, вызывают aГУС. Важно отметить, что *S.pneumoniae* особенно эффективна при активации комплемента и осуществляет эту

функцию посредством LEA-2. Таким образом, предполагается, что в случае не-кишечного ГУС, ассоциированного с пневмококковой инфекцией, манифестации микроангиопатии, уремии и гемолиза индуцируются преимущественно за счет активации LEA-2, и, предполагается, что агенты, блокирующие LEA-2, включая анти-MASP-2 антитела, будут предотвращать прогрессирование аГУС или снижать тяжесть этого заболевания у пациентов. В соответствии с этим, в другом своем аспекте, настоящее изобретение включает лечение пациента, страдающего не-кишечным аГУС, вызываемым инфекцией *S.pneumoniae*, путем введения эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента.

ТТП.

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) является опасным для жизни расстройством системы свертывания крови, вызываемым аутоиммунными или наследственными дисфункциями, которые активируют каскад реакций свертывания крови или систему комплемента (George J.N., *N. Engl. J. Med.*; 354:1927-35, 2006). Это приводит к образованию многочисленных микроскопических сгустков или тромбов в небольших кровеносных сосудах по всему телу, что является характерным признаком ТМА. Эритроциты подвергаются напряжению сдвига, который повреждает их мембраны, что приводит к внутрисосудистому гемолизу. В результате этого уменьшается приток крови и повреждаются эндотелий, что приводит к повреждению органов, включая головной мозг, сердце и почки. ТТП клинически характеризуется тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией, неврологическими изменениями, почечной недостаточностью и лихорадкой. В то время когда еще не был известен плазмаферез, уровень смертности при заболеваниях в острой форме составлял 90%. Даже при применении плазмафереза, у 80% пациентов с таким заболеванием, продолжительность жизни составляет приблизительно шесть месяцев.

ТТП может возникать в результате генетического или приобретенного ингибирования фермента ADAMTS-13, т.е. металлопротеазы, ответственной за расщепление крупных мультимеров фактора фон Виллебранда (vWF) на более мелкие фрагменты. Ингибирование или дефицит ADAMTS-13, в конечном счете, приводит к увеличению уровня свертывания крови (Tsai H.J. *Am. Soc. Nephrol.* 14: 1072-1081, 2003). ADAMTS-13 регулирует активность vWF; а в отсутствии ADAMTS-13, vWF образуют крупные мультимеры, которые имеют тенденцию к связыванию с тромбоцитами, что будет вызывать предрасположенность у пациентов к агрегации тромбоцитов и тромбозу в микрососудах.

Многочисленные мутации в ADAMTS13 были выявлены у индивидуумов с ТТП. Это заболевание также может развиваться из-за присутствия аутоантител против ADAMTS-13. Кроме того, ТТП может развиваться при раке молочной железы, желудочно-кишечного тракта или предстательной железы (George J.N., *Oncology (Williston Park).* 25:908-14, 2011), при беременности (на втором триместре или после родов) (George J.N., *Curr. Opin. Hematol.* 10:339-344, 2003), или ТТП может ассоциироваться с такими заболеваниями, как ВИЧ-инфекции или аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка (Hamasaki K. et al., *Clin. Rheumatol.* 22:355-8, 2003). ТТП может также вызываться некоторыми терапевтическими лекарственными средствами, включая гепарин, хинин, иммуно-опосредованный ингридиент, противораковые химиотерапевтические средства (блеомицин, цисплатин, цитозин-арабинозид, дауномицин, гемцитабин, митомицин С и тамоксифен), циклоспорин А, пероральные контрацептивы, пенициллин, рифампин и анти-тромбоцитарные лекарственные средства, включая тиклопидин и клопидогрел (Azarm. T. et al., *J. Res. Med. Sci.*, 16: 353-357, 2011). Другими факторами или состояниями, ассоциированными с ТТП, являются токсины, такие как пчелиный яд, сепсис, секвестрация в селезенке, трансплантация, васкулит, сосудистая хирургия и инфекции, такие как *Streptococcus pneumoniae* и цитомегаловирус (Moake J.L., *N. Engl. J. Med.*, 347:589-600, 2002). ТТП, обусловленная временным функциональным дефицитом ADAMTS-13, может возникать в результате повреждения эндотелиальных клеток, ассоциированного с инфекцией *S.pneumoniae* (*Pediatr. Nephrol.*, 26:631-5, 2011).

Стандартным лечением ТТП является плазмаферез (Rock G.A. et al., *N. Engl. J. Med.* 325:393-397, 1991). Плазмаферез заменяет активность ADAMTS-13 у пациентов с генетическими дефектами и удаляет аутоантитела против ADAMTS-13 у пациентов с приобретенной аутоиммунной ТТП (Tsai H.-M. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 21(4): 609-v, 2007). Обычно в такой терапии используют дополнительные средства, такие как иммунодепрессанты (George. J.N., *N. Engl. J. Med.* 354:1927-35, 2006). Однако плазмаферез не дает успеха приблизительно у 20% пациентов, а у более чем одной трети пациентов возникают рецидивы, и к тому же плазмаферез является дорогостоящим и требует сложного технического оснащения. Кроме того, многие пациенты не в состоянии выдерживать процедуру плазмафереза. Следовательно, существует крайняя необходимость в разработке дополнительных и более эффективных способов лечения ТТП.

Поскольку ТТП представляет собой нарушение каскада реакций свертывания крови, то лечение с помощью антагонистов системы комплемента поможет стабилизировать и снизить тяжесть заболевания. Хотя патологическая активация альтернативного пути комплемента ассоциируется с аГУС, однако, роль активации комплемента в ТТП пока не очень ясна. Функциональный дефицит ADAMTS13 играет важную роль в восприимчивости к ТТП, однако этого недостаточно для того, чтобы вызвать заболевание в острой фазе. Факторы окружающей среды и/или другие генетические модификации могут вносить свой вклад в манифестации ТТП. Так, например, гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции каскада

реакций свертывания крови, vWF, функции тромбоцитов, компоненты поверхности эндотелиальных сосудов или система комплемента могут также участвовать в развитии острой тромботической микроангиопатии (Galbusera M. et al., *Haematologica*, 94: 166-170, 2009). В частности, было показано, что активация комплемента играет критическую роль, и было показано, что сыворотка пациента с тромботической микроангиопатией, ассоциированной с дефицитом ADAMTS-13, является причиной осаждения C3 и MAC и последующей активации нейтрофилов, которые могут быть элиминированы путем инактивации комплемента (Ruiz-Torres M.P. et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52, 2005). Кроме того, недавно было показано, что во время острых приступов ТТП, уровни C4d, C3bBbC3bBbP и C3a повышаются (M. Reti et al., *J. Thromb. Haemost.* 10(5):791-798, 2012), что соответствует активации классического, лектинового и альтернативного путей. Это приводит к усилению активации комплемента при острых приступах и может инициировать активацию терминального пути, а также вызывать еще большее обострение ТТП.

Очевидно, что ADAMTS-13 и vWF в ТТП играют ответственную роль в активации и агрегации тромбоцитов и, тем самым, определенную роль в напряжении сдвига и в осаждении при микроангиопатиях. Активированные тромбоциты взаимодействуют с классическими и альтернативными путями комплемента и стимулируют эти пути. Опосредованная тромбоцитами активация комплемента приводит к повышению уровней медиаторов воспаления C3a и C5a (Peerschke E. et al., *Mol. Immunol.*, 47:2170-5 (2010)). Таким образом, тромбоциты могут служить в качестве мишеней при активации классического пути комплемента в случае наследственной или аутоиммунной ТТП.

Как описано выше, лектин-зависимая активация комплемента, обусловленная тромбин-подобной активностью MASP-1 и LEA-2-опосредованной активацией протромбина, является доминирующим молекулярным путем, вызывающим эндотелиальные повреждения после свертывания крови и микрососудистого тромбоза, которые наблюдаются при ГУС. Аналогичным образом, активация LEA-1 и LEA-2 может непосредственно индуцировать систему свертывания крови при ТТП. Активация пути LEA-1 и LEA-2 может быть инициирована в ответ на начальное повреждение эндотелия, вызываемое дефицитом ADAMTS-13 при ТТП. Таким образом, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2, включая, но не ограничиваясь ими, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, функцию MASP-1, функцию MASP-3 или функцию MASP-1 и MASP-3, будут ослаблять микроангиопатии, ассоциированные с микрососудистым свертыванием крови, тромбозом и гемолизом у пациентов, страдающих ТТП.

Пациенты, страдающие ТТП, обычно, доставляются в кабинет неотложной помощи с одним или более состояниями, такими как пурпура, почечная недостаточность, низкое число тромбоцитов, анемия и/или тромбоз, включая инсульт. В настоящее время, стандартное лечение ТТП включает введение катетера (например, внутривенного катетера или катетера в другой форме) для заместительного плазмафереза в течение двух недель или более, а обычно, три раза в неделю, вплоть до ежедневного введения. Если у индивидуума наблюдается положительный результат на наличие ингибитора ADAMTS13 (т.е. эндогенного антитела против ADAMTS13), то плазмаферез может быть осуществлен в комбинации с иммуносупрессорной терапией (например, путем введения кортикостероидов, ритуксана или циклоспорина). У пациентов с рецидивирующей ТТП (приблизительно 20% пациентов с ТТП) не наблюдается какого-либо ответа на терапию посредством плазмафереза по крайней мере в течение двух недель.

В соответствии с вышеизложенным, в одном из вариантов осуществления изобретения, при установке начального диагноза ТТП, или при наличии у индивидуума одного или более симптомов, соответствующих диагнозу ТТП (например, поражение центральной нервной системы, тяжелая тромбоцитопения (число тромбоцитов меньше или равно 5000/мкл, если аспирин не вводили, или меньше или равно 20000/мкл, если вводили аспирин), тяжелое поражение сердца, тяжелое поражение легких, инфаркт желудочно-кишечного тракта или гангрена), способ лечения индивидуума включает введение эффективного количества LEA-2-ингибирующего агента (например, анти-MASP-2 антитела) или LEA-1-ингибирующего агента (например, анти-MASP-1 или анти-MASP-3 антитела) в качестве терапии первого ряда без плазмафереза или в комбинации с плазмаферезом. В качестве терапии первого ряда LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующий агент вводят индивидууму в качестве терапии первого ряда в отсутствие плазмафереза во избежание возможных осложнений плазмафереза, таких как кровотечение, инфекция и осложнения и/или аллергии, присущие донору плазмы, или, в другом случае, если у индивидуума имеется непереносимость плазмафереза, или в условиях, когда плазмаферез недоступен. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующий агент вводят индивидууму, страдающему ТТП в комбинации (включая совместное введение) с иммуносупрессорным агентом (например, кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином) и/или в комбинации с концентрированным ADAMTS13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему ТТП, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, при острой фазе с продолжительностью по меньшей мере от одного дня до одной недели или двух недель) с последующим введением LEA-1-и/или LEA-2-ингибирующего агента подкожно в течение второго периода времени (например, при хронической фазе

по меньшей мере в течение двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в течение первого и/или второго периода времени осуществляют без плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ применяют для поддержания состояния индивидуума в целях предотвращения у индивидуума одного или более симптомов, ассоциированных с ТТП.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего не поддающейся лечению ТТП (т.е. в случае, когда у него не наблюдается ответа на терапию посредством плазмафереза в течение по меньшей мере двух недель), путем введения ингибитора LEA-1 и/или LEA-2 в количестве, эффективном для ослабления одного или более симптомов ТТП. В одном варианте осуществления изобретения, ингибитор LEA-1 и/или LEA-2 вводят индивидууму с не поддающейся лечению ТТП в течение длительного периода времени, например, в течение по меньшей мере двух недель или более, путем подкожного введения или парентерального введения другим путем. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ также включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у индивидуума до лечения, и, возможно, во время лечения, где наличие пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или значением у здорового индивидуума указывает на необходимость продолжения лечения с использованием LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующего агента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение, либо подкожно, либо внутривенно, LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему ТТП или индивидууму с риском развития ТТП. Предпочтительно, чтобы лечение проводилось ежедневно, но оно может быть проведено не реже, чем раз в месяц. Лечение продолжают до тех пор, пока число тромбоцитов индивидуума не превысит 150000/мл по меньшей мере в течение двух дней подряд.

В целом, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 должны давать независимый положительный терапевтический эффект при лечении ТМА, включая ГУС, аГУС и ТТП. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые вместе, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с эффектом любого отдельно взятого агента, либо они могут обеспечивать эффективное лечение для подгрупп пациентов более широкого спектра, страдающих различными формами ТМА. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести тромботической микроангиопатии, такой как гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС) или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему тромботической микроангиопатией, или индивидууму с риском развития такого заболевания. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неопиоидных агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В одном из вариантов осуществления изобретения, способ согласно этому аспекту изобретения дополнительно включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести тромботической микроангиопатии, такой как гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС) или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) у индивидуума, страдающего тромботической микроангиопатией, или у индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP1/3-ингибирующего агента. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат у пациентов при лечении, профилактике или ослаблении тяжести тромботической микроангиопатии по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспеци-

фического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести тромботической микроангиопатии у индивидуума, страдающего тромботической микроангиопатией, или у индивидуума с риском развития такого заболевания. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как тромботическая микроангиопатия (например, гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП)).

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего тромботической микроангиопатией (например, гемолитическим уремическим синдромом (ГУС), атипическим гемолитическим уремическим синдромом (аГУС) или тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП)), или индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития тромботической микроангиопатии (например, гемолитического уремического синдрома (ГУС), атипического гемолитического уремического синдрома (аГУС), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) или TMA, ассоциированной с трансплантацией (ТА-TMA), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

G. Роль MASP-3 в развитии астмы и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Астма является распространенным хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей. В Соединенных Штатах астмой страдают приблизительно 25 млн человек, в том числе 7 млн детей в возрасте до 18 лет, причем более половины из них испытывают по меньшей мере один приступ астмы каждый год, что приводит к более чем 1,7 млн посещений отделений неотложной помощи и 450000 госпитализаций в год (см. на сайте www.gov/health/prof/lung/asthma/naci/asthma-info/index.htm, размещенном 4 мая, 2012). Это заболевание является гетерогенным и имеет множество клинических фенотипов. Наиболее распространенным фенотипом является аллергическая астма. Другими фенотипами являются неаллергическая астма, респираторное заболевание, которое обостряется при приеме аспирина, постинфекционная астма, профессиональная астма, астма, индуцированная воздушными раздражителями и астма, индуцированная физическими упражнениями. Кардинальными признаками аллергической астмы являются гиперчувствительность дыхательных путей (ГДП) к различным специфическим и неспецифическим раздражителям, избыточное продуцирование слизи в дыхательных путях, легочная эозинофилия и повышение концентрации сывороточного IgE. Симптомы астмы включают кашель, хрипы, тяжесть в груди и одышку. Целью лечения астмы является устранение заболевания и минимизация обострений, ежедневных симптомов, и обеспечение пациентам физической активности. В настоящее время, рекомендации по лечению включают поэтапные процедуры до полного устранения астмы. Первая стадия лечения включает, если

это необходимо, введение быстродействующего β_2 -агониста путем ингаляции; а затем введение противоастматических лекарственных средств, таких как кортикостероиды, вводимые путем ингаляции; β_2 -агонисты длительного действия, вводимые путем ингаляции; лекарственные средства-модификаторы лейкотриена; теофиллин, пероральные глюкокортикостероиды и анти-IgE моноклональное антитело.

Хотя астма по своему происхождению является многофакторным заболеванием, однако, принято считать, что она возникает в результате неадекватных иммунологических ответов на общие природные антигены у генетически восприимчивых индивидуумов. Астма ассоциируется с активацией комплемента, и анафилотоксины (АТ) С3а и С5 обладают провоспалительными и иммунорегуляторными свойствами, которые приводят к развитию и модуляции аллергической реакции (Zhang X. and Kohl, J. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 6:269-211, 2010). Однако относительное участие классического, альтернативного и лектинового пути комплемента в развитии астмы недостаточно хорошо изучено. Альтернативный путь может активироваться на поверхности аллергенов, а лектиновый путь может активироваться посредством распознавания аллергенных полисахаридных структур, причем, оба эти процесса, приводят к образованию АТ. Комплемент может активироваться различными путями в зависимости от аллергена, вызывающего астму. В высокой степени аллергенная пыльца растения семейства *Parietaria*, например, является очень эффективной для стимуляции MBL-зависимой активации С4 с участием LEA-2. В отличие от этого, аллерген клеща домашней пыли не требует MBL для активации комплемента (Varga et al. *Mol. Immunol.*, 39 (14):839-46, 2003).

Внешние раздражители, вызывающие астму, могут активировать комплемент по альтернативному пути. Так, например, *in vitro* воздействие на человеческую сыворотку сигаретного дыма или частиц в выхлопных газах приводит к активации комплемента, и этот эффект не зависит от присутствия EDTA, что указывает на то, что активация происходит по альтернативному, но не по классическому пути (Robbins R.A. et al. *Am. J. Physiol.* 260: L254-L259, 1991; Kanemitsu H. et al., *Biol. Pharm. Bull.* 21:129-132, 1998). Роль путей комплемента в аллергическом воспалении дыхательных путей оценивали на мышинной модели сенсибилизации и стимуляции овальбумином. У мышей дикого типа развивались ГДП и воспаление дыхательных путей в ответ на стимуляцию аэроаллергеном. Гибридный белок "C γ g-Ig-антитело", который ингибирует все пути активации комплемента, был эффективен в предотвращении ГДП и воспаления легких при его введении системно или местно путем ингаляции мышам с моделью аллергического воспаления легких, инициируемого овальбумином (Taube et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 168(11):1333-41, 2003).

По сравнению с мышами дикого типа у мышей с дефицитом фактора В наблюдались менее выраженная ГДП и воспаление дыхательных путей, тогда как у С4-дефицитных мышей наблюдались эффекты, аналогичные эффектам у мышей дикого типа (Taube C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8084-8089, 2006). Эти результаты подтверждают участие альтернативного пути, но не классического пути, в мышинной модели стимуляции аэроаллергеном. Дополнительное подтверждение важной роли альтернативного пути было получено в исследовании фактора Н (fH) с использованием той же самой мышинной модели (Takeda K. et al., *J. Immunol.* 188:661-667, 2012). fH является негативным регулятором альтернативного пути и действует как агент, предотвращающий аутологичное повреждение тканей, в которых он присутствует. Было установлено, что эндогенный fH присутствует в дыхательных путях во время стимуляции аллергеном, а ингибирование fH рекомбинантным конкурентным антагонистом приводило к обострению ГДП и воспаления дыхательных путей (Takeda et al., 2012, см. выше). Терапевтическая доставка CR2-fH, т.е. химерного белка, который связывает iC3b/c3d-связывающую область CR2 с комплемент-регулирующей областью fH, которая нацеливает комплемент-регулирующую активность fH на сайты существующей активации комплемента, обеспечивала защиту от развития ГДП и от инфильтрации эозинофилов в дыхательные пути после стимуляции аллергеном (Takeda et al., 2012, см. выше). Протективный эффект был продемонстрирован с использованием овальбумина, а также аллергена амброзии, который является релевантным аллергеном для стимуляции аллергии у человека.

Роль лектин-зависимой активации комплемента при астме оценивали у мышей с моделью грибковой астмы (Hogaboam et al., *J. Leukocyte Biol.* 75:805-814, 2004). В этих исследованиях использовали мышей, генетически дефицитных по маннан-связывающему лектину А (MBL-A), т.е. углевод-связывающему белку, функционирующему как компонент, распознающий активацию лектиновых путей комплемента. MBL-A(+/-)- и MBL-A(-/-)-мышей, сенсибилизированных *Aspergillus fumigatus*, исследовали на дни 4 и 28 после *i.t.*-сенсибилизации *A. fumigatus* конидиями. ГДП у сенсибилизированных MBL-A(-/-)-мышей значительно ослаблялась каждый раз после заражения конидиями по сравнению с группой сенсибилизированных MBL-A(+/-)-мышей. Уровни цитокинов Th2 в легких (IL-4, IL-5 и IL-13) были значительно ниже у *A. fumigatus*-сенсибилизированных MBL-A(-/-)-мышей по сравнению с группой мышей дикого типа на 4-й день после заражения конидиями. Эти результаты указывают на то, что MBL-A и лектиновый путь играют важную роль в развитии и поддержании ГДП при хронической грибковой астме.

Полученные результаты, подробно описанные выше, позволяют предположить о роли лектин-зависимой активации комплемента в патогенезе астмы. Экспериментальные данные указывают на то, что активация фактора В играет решающую роль. Исходя из фундаментальной роли LEA-1 в лектин-

зависимой активации фактора В и последующей активации альтернативного пути было высказано предположение, что LEA-1-блокирующие агенты могут быть эффективными для лечения определенных форм астмы, опосредованной альтернативным путем. Таким образом, указанное лечение может быть особенно эффективным для устранения астмы, индуцированной клещом домашней пыли, или астмы, вызываемой внешними раздражителями, такими как сигаретный дым или выхлопные газы. С другой стороны, астматические реакции, вызываемые пылью растений, вероятно, вызывают LEA-2-зависимую активацию комплемента. Следовательно, предполагается, что LEA-2-блокирующие агенты являются особенно подходящими для лечения астматических состояний у этой подгруппы пациентов.

С учетом данных, описанных выше, авторами настоящего изобретения было высказано предположение, что LEA-1 и LEA-2 опосредуют патологическую активацию комплемента при астме. В зависимости от провоцирующих аллергических агентов в развитии астмы могут участвовать преимущественно LEA-1 или LEA-2. Таким образом, LEA-1-блокирующий агент в сочетании с LEA-2-блокирующим агентом могут быть эффективными для лечения различных форм астмы независимо от их этиологии. LEA-1 и LEA-2-блокирующие агенты могут давать комплементарный, аддитивный или синергический эффект в профилактике, лечении или устранении воспаления легких и симптомов астмы.

Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести астмы, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему астмой, или индивидууму с риском развития астмы. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ согласно этому аспекту изобретения дополнительно включает ингибирование LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести астмы, где указанный способ включает введение индивидууму, страдающему астмой, или индивидууму с риском развития астмы терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP1/3-ингибирующего агента. Как подробно описано выше, предполагается, что использование комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет улучшать терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести астмы по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и, необязательно, MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести ас-

тмы у индивидуума, страдающего астмой, или у индивидуума с риском развития астмы. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как астма.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего астмой, или индивидуума с риском развития астмы, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития астмы, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

Н. Роль MASP-3 в развитии болезни плотных отложений и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Мембранопролиферативный гломерулонефрит (МПГН) представляет собой почечное расстройство, морфологически характеризующееся пролиферацией мезангиальных клеток и утолщением стенки клубочковых капилляров вследствие субэндотелиального расширения мезангия. МПГН классифицируются как первичные (также называемые идиопатическими) или вторичные, ассоциированные с основными заболеваниями, такими как инфекционные заболевания, заболевания системных иммунных комплексов, новообразования, хроническое заболевание печени и т.п. Идиопатический МПГН включает три морфологических типа. Заболевание Типа I, или классический МПГН, характеризуется субэндотелиальными отложениями иммунных комплексов и активацией классического пути комплемента. Заболевание Типа II, или болезнь плотных отложений (БПО), характеризуются дополнительными внутримембранными плотными отложениями. Заболевание Типа III характеризуется дополнительными субэпителиальными отложениями. Идиопатический МПГН является редким заболеванием и встречается приблизительно у 4-7% пациентов с первичными заболеваниями почек, вызывающими нефротический синдром (Alchi B. and Jayne D. *Pediatr. Nephrol.* 25:1409-1418, 2010). МПГН, главным образом, встречается у детей и молодых людей и может проявляться как нефротический синдром, острый почечный синдром, бессимптомная протеинурия и гематурия, или острая рецидивирующая гематурия. У большинства пациентов происходит нарушение функции почек, и заболевание имеет медленно прогрессирующее течение, причем, приблизительно у 40% пациентов развивается почечная недостаточность в терминальной стадии в течение 10 лет после постановки диагноза (Alchi and Jayne, 2010, см. выше). Современные методы лечения включают применение кортикостероидов, иммунодепрессантов, антитромбоцитарные курсы лечения и плазмаферез.

БПО диагностируется по отсутствию иммуноглобулина и присутствию C3 в анализе на иммунофлуоресцентное окрашивание почечных биоптатов, а электронная микроскопия показывает характерные плотные осmioфильные отложения вдоль гломерулярных базальных мембран. БПО вызывается нарушением регуляции альтернативного пути комплемента (Sethi et al. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6(5):1009-17, 2011), которое может вызываться рядом различных механизмов. Наиболее распространенной аномалией системы комплемента при БПО является наличие почечных факторов C3, которые представляют собой аутоантитела против C3-конвертазы альтернативного пути (C3bBbC3bBb), которые увеличивают их время полужизни и, следовательно, усиливают активацию пути (Smith R.J.H. et al., *Mol. Immunol.* 48:1604-1610, 2011). Другими альтернативными аномалиями пути является присутствие аутоантитела против фактора H, которое блокирует функцию фактора H, усиливает функцию C3-мутации и создает генетический дефицит фактора H (Smith et al., 2011, см. выше). Последние отчеты показали, что лечение эклизумабом (моноклональным анти-C5 антителом) ассоциируется с улучшением функции почек у двух пациентов с БПО (Daina E. et al., *New Engl. J. Med.* 366:1161-1163, 2012; Vivarelli M. et al., *New Engl. J. Med.* 366:1163-1165, 2012), что указывает на причинную роль активации комплемента в исходе почечного заболевания.

Если учесть вышеуказанные генетические, функциональные, иммуногистохимические и интересные клинические данные, то со всей очевидностью можно сказать, что комплемент играет центральную роль в патогенезе БПО. Таким образом, предполагается, что терапевтическое лечение, которое блокирует механизмы активации комплемента, вызывающие заболевание, или последующие продукты активации комплемента будет терапевтически эффективным для лечения этого состояния.

Хотя генетические данные человека, предположительно, указывают на то, что несоответствующая регуляция или избыточная активация петли амплификации альтернативного пути играет ключевую роль, однако, события инициации комплемента пока еще не были идентифицированы. Иммуногистохимиче-

ские исследования почечного биоптата подтверждают осаждение MBL в пораженной ткани, что указывает на возможное участие лектиновых путей в инициации патологической активации комплемента при БПО (Lhotta et al, *Nephrol Dial Transplant.*, 14(4):881-6, 1999). Важная роль альтернативного пути была дополнительно подтверждена на экспериментальных моделях. У мышей с дефицитом фактора H развивается прогрессирующая протеинурия и почечные патологические повреждения, характерные для такого состояния у человека (Pickering et al., *Nat. Genet.*, 31(4):424, 2002). Pickering и др. также показали, что удаление фактора В, который опосредует LEA-1-зависимую активацию альтернативного пути, приводит к полной защите мышей с дефицитом фактора H от БПО (Pickering et al., *Nat. Genet.*, 31(4):424, 2002).

Таким образом, можно предположить, что агенты, блокирующие LEA-1, будут эффективно блокировать лектин-зависимую активацию альтернативного пути, и, таким образом, обеспечивать эффективное лечение БПО. Принимая во внимание тот факт, что у пациентов с БПО нарушается регуляция петли амплификации альтернативного пути дизрегуляции, можно также ожидать, что агенты, которые блокируют петлю амплификации, будут эффективными. Поскольку агенты, нацеленные на LEA-1, блокируют MASP-1 или MASP-1 и MASP-3 и ингибируют созревание фактора D, то было предсказано, что такие агенты будут эффективно блокировать петлю амплификации альтернативного пути.

Как подробно описано выше, было обнаружено, что явно выраженное осаждение MBL в образцах пораженных почек, со всей очевидностью указывает на возможное участие инициированных лектином событий активации в патогенезе БПО. После первоначального повреждения тканей в капиллярах клубочков было высказано предположение, что MBL также связываются с поврежденным клубочковым эндотелием, и в этом участвуют мезангиальные структуры. Хорошо известно, что такие повреждения ткани приводят к активации LEA-2, что, в свою очередь, может приводить к дополнительной активации комплемента. Следовательно, также предполагается, что LEA-2-блокирующие агенты также являются эффективными в предотвращении последующей активации комплемента на поврежденных клубочковых структурах, и, таким образом, в предотвращении последующего прогрессирования заболевания, приводящего к терминальной стадии почечной недостаточности.

Данные, подробно описанные выше, позволяют предположить, что LEA-1 и LEA-2 способствуют развитию отдельных патологических процессов активации комплемента при БПО. Таким образом, LEA-1-блокирующий агент и LEA-2-блокирующий агент, взятые отдельно или в комбинации, будут, как ожидается, эффективными для лечения БПО.

LEA-1- и LEA-2-блокирующие агенты, используемые в комбинации, как ожидается, будут более эффективными, чем любой из отдельно взятых агентов, или будут эффективными для лечения различных стадий заболевания. Таким образом, LEA-1- и LEA-2-блокирующие агенты могут давать комплементарный, аддитивный или синергический эффект в профилактике, лечении или устранении почечной недостаточности, ассоциированной с БПО.

Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующими агентами с ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести болезни плотных отложений, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему болезнью плотных отложений, или индивидууму с риском развития этой болезни. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например, внутриапериартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести болезни плотных отложений, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему болезнью плотных отложений, или индивидууму с риском такого заболевания. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести болезни плотных отложений, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, страдающему болезнью плотных отложений, или индивидууму с риском развития этой болезни.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести болезни плотных отложений, по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

LEA-1- и/или LEA-2-ингибирующие агенты могут быть введены индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неперпептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести болезни плотных отложений у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как болезнь плотных отложений.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего болезнью плотных отложений, или индивидуума с риском развития такой болезни, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития болезни плотных отложений, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

I. Роль MASP-3 в развитии олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Олигоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит (ОНСГ) является формой быстро прогрессирующего гломерулонефрита, при котором стенка капилляров клубочков имеет признаки воспаления с плохо детектируемым осаждением иммунных комплексов или антител против гломерулярной базальной мембраны. Это состояние ассоциируется с быстрым снижением функции почек. Было обнаружено, что у большинства пациентов с ОНСГ присутствуют аутоантитела против цитоплазматических нейтрофилов (ANCA), и следовательно, это заболевание принадлежит к группе заболеваний, называемых ANCA-ассоциированным васкулитом. Васкулит представляет собой расстройство кровеносных сосудов, характеризующееся воспалением и фибриноидным некрозом стенки сосуда. Системные васкулиты классифицируются в зависимости от размера сосудов: большого, среднего и малого. Некоторые формы васкулита мелких сосудов связаны с наличием ANCA, и такими формами являются гранулематоз Вегенера, микроскопический полиангиит, синдром Черга-Штраусса и почечный ограниченный васкулит (ОНСГ). Они могут быть также манифестацией основных состояний, таких как системная красная волчанка. Ан-

тигенами-мишенями для ANCA являются протеиназа-3 (PR3) и миелопероксидаза (MPO). Олигоиммунный ОНCG встречается редко, т.е. как сообщалось, он встречается приблизительно у 4 человек на миллион в Уэссексе, в Великобритании (Hedger N. et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:1593-1599, 2000). В уэссекской группе из 128 пациентов с олигоиммунным ОНCG, 73% были ANCA-положительным, и начальный диализ потребовался для 59% пациентов, а 36% пациентов должны были пройти диализ в течение продолжительного периода времени. Лечение олигоиммунного ОНCG включает введение кортикостероидов и иммуносупрессорных агентов, таких как циклофосфамид и азатиоприн. Дополнительные варианты лечения ANCA-ассоциированных васкулитов включают введение ритуксимаба и плазмаферез (Chen M. and Kallenberg, C.G.M. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6:653-664, 2010).

Хотя ОНCG характеризуется недостаточностью осаждения комплемента, однако, в патогенезе ОНCG участвует альтернативный путь комплемента. Анализ почечного биоптата у 7 пациентов с MPO-ANCA-ассоциированным олигоиммунным ОНCG обнаруживал присутствие мембраноатакующего комплекса, C3d, фактора В и фактора Р (которые не были обнаружены в биоптатах у нормального контроля или у пациентов с минимальными патологическими отклонениями), тогда как C4d и лектин, связывающийся с маннозой, не были обнаружены, что указывало на селективную активацию альтернативного пути (Xing, G.Q. et al. *J. Clin. Immunol.* 29:282-291, 2009). Экспериментальная ОНCG может быть также инициирована путем переноса анти-MPO IgG мышам дикого типа или антитела против MPO спленоцитов иммуно-дефицитным мышам (Xiao H. et al. *J. Clin. Invest.* 110:955-963, 2002). У этой мышинной модели ОНCG, роль специфических путей активации комплемента исследовали с использованием мышей с нокаутом. После инъекции анти-MPO IgG, у C4^{-/-}-мышей развивалось почечное заболевание по сравнению с мышами дикого типа, тогда как у C5^{-/-}-мышей и у мышей с дефицитом фактора В, почечное заболевание не развивалось, что свидетельствует о том, что в этой модели участвует альтернативный путь, но не классический и лектиновый путь (Xiao H. et al. *Am. J. Pathol.* 170:52-64, 2007). Кроме того, инкубирование MPO-ANCA или PR3-ANCA IgG, взятых у пациентов, с TNF-примированными человеческими нейтрофилами приводило к высвобождению факторов, которые активировали комплемент в нормальной человеческой сыворотке, на что указывало продуцирование C3a, но этот эффект не наблюдался при использовании IgG здоровых индивидуумов, что позволяет предположить о возможной патогенной роли ANCA в активации нейтрофилов и комплемента (Xiao et al., 2007, см. выше).

Исходя из роли, описанной выше для альтернативного пути при этом состоянии, можно предположить, что блокирование активации альтернативного пути будет эффективным для лечения ANCA-позитивного ОНCG. Принимая во внимание тот факт, что для патогенеза необходима активация fB, то предполагается, что ингибиторы LEA-1 будут особенно эффективными для лечения этого состояния, а также для предотвращения дальнейшего снижения функции почек у этих пациентов.

У еще одной подгруппы пациентов развивается прогрессирующий почечный васкулит с образованием серповидных клеток, которое сопровождается быстрым снижением функции почек при отсутствии ANCA. Эта форма заболевания называется ANCA-негативным ОНCG (Chen et al., *JASN* 18(2): 599-605, 2007). Обычно, такое заболевание развивается у более молодых пациентов, и это почечное заболевание имеет тенденцию к неблагоприятному исходу (Chen et al., *Nat. Rev. Nephrol.*, 5(6):313-8, 2009). Характерным патологическим признаком заболевания у этих пациентов является осаждение MBL и C4d при поражениях почек (Xing et al., *J. Clin. Immunol.* 30(1):144-56, 2010). Интенсивность окрашивания MBL и C4d в почечных биоптатах отрицательно коррелирует с функцией почек (Xing et al., 2010, см. выше). Эти данные свидетельствуют о важной роли лектин-зависимых активаций комплемента в патогенезе. Тот факт, что в образцах пораженной ткани обычно обнаруживается C4d, но не фактор В, указывает на участие LEA-2.

Исходя из роли лектин-зависимой активации комплемента при ANCA-негативном ОНCG, описанном выше, было высказано предположение, что блокирование активации LEA-2-пути будет эффективным для лечения ANCA-негативного ОНCG.

Данные, подробно описанные выше, позволяют предположить, что LEA-1 и LEA-2 опосредуют патологическую активацию комплемента в ANCA-положительном и ANCA-отрицательном ОНCG, соответственно. Таким образом, предполагается, что LEA-1-блокирующий агент в сочетании с LEA-2-блокирующим агентом будет эффективным для лечения всех форм олигоиммунного ОНCG, независимо от их этиологии. Таким образом, LEA-1- и LEA-2-блокирующие агенты могут давать комплементарный, аддитивный или синергический эффект в профилактике, лечении или устранении ОНCG-ассоциированной почечной недостаточности.

Ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом и могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2 ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему олигоиммунным некротизирующим серповидным гломерулонефритом, или индивидууму с риском развития этой болезни. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему олигоиммунным некротизирующим серповидным гломерулонефритом, или индивидууму с риском такого заболевания. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будут давать улучшенный терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент могут быть введены индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежедневно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как олигоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит (ОНСГ).

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего олигоиммунным некротизирующим серповидным гломерулонефритом (ОНСГ), или индивидуума с риском развития такой болезни, где указанный способ включает введение

эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, в целях лечения или снижения риска развития олигоиммунного некрозирующего серповидного гломерулонефрита (ОНСГ), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

I. Роль MASP-3 при черепно-мозговой травме и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) представляет собой одну из основных проблем глобального здравоохранения и является причиной по меньшей мере 10 миллионов летальных исходов или госпитализации в год (Langlois J.A. et al., *J. Head Trauma Rehabil.* 21:375-378, 2006). В 2003 году, по оценкам специалистов, в Соединенных Штатах было зарегистрировано 1,6 миллиона ЧМТ, в том числе 1,2 миллиона посещений отделений неотложной помощи, 290000 госпитализаций и 51000 смертей (Rutland-Brown W. et al., *J. Head Trauma Rehabil.* 21:544-548, 2006). Большинство ЧМТ в Соединенных Штатах вызваны падениями и дорожно-транспортными происшествиями. ЧМТ может приводить к длительным или пожизненным физическим, когнитивным, поведенческим и эмоциональным последствиям. Более 5 миллионов американцев имеют стойкую нетрудоспособность или пожизненную инвалидность, связанную с ЧМТ (Langlois et al., 2006, см. выше).

ЧМТ может включать проникающее повреждение мозгового вещества ("проникающую" травму) или травмы, которые не проникают в мозг ("закрытые" травмы). Профили травм и связанные с ними нейроповеденческие последствия могут значительно различаться для проникающих и закрытых ЧМТ. Хотя каждая травма является уникальной, однако, некоторые участки головного мозга являются особенно уязвимыми для повреждения, индуцированного травмами, включая лобную кору головного мозга и субфронтальное белое вещество, базальные ганглии и промежуточный мозг, ростральный ствол головного мозга, а также височные доли, включая гиппокамп (McAllister T.W. *Dialogues Clin. Neurosci.* 13:287-300, 2011). ЧМТ может приводить к изменениям в нескольких нейромедиаторных системах, включая высвобождение глутамата и других возбуждающих аминокислот в период острой фазы и к хроническим изменениям в катехоламинергических и холинергических системах, которые могут быть ассоциированы с нейроповеденческими нарушениями (McAllister, 2011, см. выше). Люди, выжившие при серьезной ЧМТ, часто страдают нарушениями когнитивных функций, личностными расстройствами и тяжелыми психическими расстройствами, а в частности, депрессией, тревожными состояниями и посттравматическим стрессовым расстройством. Несмотря на интенсивные исследования до сих пор не существует какого-либо клинически эффективного лечения ЧМТ, которое могло бы снизить смертность и заболеваемость и улучшить результаты функционального лечения.

Факторы комплемента и ЧМТ.

Многочисленные исследования выявили взаимосвязь между белками комплемента и неврологическими расстройствами, включая болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, тяжелую миастению, синдром Гийена-Барре, церебральную волчанку и инсульт (см. обзор Wagner E. et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 9: 43-56, 2010). В последнее время была продемонстрирована роль C1q и C3 в элиминации синапса, а поэтому считается, что факторы комплемента, вероятно, участвуют как в нормальных функциях ЦНС, так и в развитии нейродегенеративного заболевания (Stevens B. et al., *Cell* 131: 1164-1178, 2007). Ген MASP-1 и MASP-3 широко экспрессируется в головном мозге, а также в глиомной клеточной линии, T98G (Kuraya M. et al., *Int. Immunol.*, 15:109-17, 2003), что соответствует роли лектинового пути в ЦНС.

MASP-1 и MASP-3 являются ключевым фактором в быстрой защите от патогенов и самих модифицированных клеток, но лектиновый путь также ответствен за тяжелое повреждение ткани после инсульта, инфаркта и других ишемическо-реперфузионных повреждений. Аналогичным образом, MASP-1 и MASP-3 являются возможными медиаторами повреждения ткани, вызываемого ЧМТ. Было показано, что ингибирование фактора В в альтернативном пути приводит к ослаблению последствий ЧМТ у двух мышинных моделей. Мыши с нокаутом фактора В были защищены от комплемент-опосредованного нейровоспаления и невропатологии после ЧМТ (Leinhase I. et al., *BMC Neurosci.* 7:55, 2006). Кроме того, антитело против фактора В ослабляло повреждение мозговой ткани и предотвращало гибель нейронов у ЧМТ-индуцированных мышей (Leinhase I. et al., *J. Neuroinflammation* 4:13, 2007). MASP-3 непосредственно активирует фактор В (Iwaki. D. et al., *J. Immunol.* 187:3751-8, 2011), а поэтому, он является возможным медиатором при ЧМТ.

Предполагается, что аналогично ингибитору фактора В, ингибиторы LEA-1, такие как антитела против MASP-3, представляют собой перспективную стратегию для лечения повреждения тканей и последующих осложнений после ЧМТ.

Таким образом, ингибиторы LEA-1 и LEA-2 могут давать независимый терапевтический эффект при ЧМТ. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, дают

аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом и могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести черепно-мозговой травмы, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму с черепно-мозговой травмой. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, интракраниально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести черепно-мозговой травмы, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму с черепно-мозговой травмой. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести черепно-мозговой травмы, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму с черепно-мозговой травмой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении или ослаблении тяжести черепно-мозговой травмы по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно, интракраниально или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и/или MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения или ослабления тяжести черепно-мозговой травмы. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как черепно-мозговая травма.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума с черепно-мозговой травмой или индивидуума с риском получения черепно-

мозговой травмы, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска получения черепно-мозговой травмы, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) переменную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

К. Роль MASP-3 в развитии аспирационной пневмонии и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Аспирация определяется как проникновение содержимого ротоглотки или желудка в нижние дыхательные пути. Аспирация может приводить к осложнениям аспирационного (химического) пневмонита, к первичной бактериальной аспирационной пневмонии, или вторичной бактериальной инфекции химического пневмонита. Факторы риска аспирации включают снижение уровня интеллекта (например, травмы головы или изменения в сенсорике, вызываемые употреблением алкоголя или наркотиков, инсульт), различные патологии желудочно-кишечного тракта и пищевода, а также нарушения нервно-мышечной системы. По оценкам специалистов, 5-15% из 4,5 миллионов случаев внебольничной пневмонии вызываются аспирационной пневмонией (Marik P.E. *New Engl. J. Med.* 344:665-671, 2001). Лечение химического пневмонита является, в основном, поддерживающим, а использование эмпирических антибиотиков является спорным. Лечение бактериальной аспирационной пневмонии осуществляют с использованием соответствующих антибиотиков, и такое лечение зависит от места аспирации, т.е. от того, происходила ли такая аспирация вне больницы или в больнице, так как этиологические факторы этих заболеваний отличаются друг от друга. При этом должны быть приняты меры по профилактике аспирации у пациентов с высоким риском, например у пациентов пожилого возраста в домах престарелых, у которых нарушаются рвотные рефлексы. Меры, которые, как было показано, способствуют эффективной профилактике, включают возвышенное положение головы в кровати во время кормления, профилактику зубов и соблюдение гигиены полости рта. Профилактическое применение антибиотиков, как было показано, является неэффективным и не рекомендуется, поскольку они могут приводить к появлению резистентных микроорганизмов.

Модуляция компонентов комплемента была предложена для лечения множества клинических состояний, включая инфекционное заболевание, такое как сепсис, вирусные, бактериальные и грибковые инфекции и легочные заболевания, такие как респираторный дистресс-синдром, хроническая обструктивная болезнь легких и кистозный фиброз (см. обзор Wagner E. et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 9: 43-56, 2010). Такое предположение было подтверждено многочисленными клиническими и генетическими исследованиями. Так, например, наблюдается значительное уменьшение числа пациентов с низкими уровнями MBL при клиническом туберкулезе (Soborg et al., *Journal of Infectious Diseases* 188:777-82, 2003), что дает основание предположить, что низкие уровни MBL указывают на защиту от такого заболевания.

На мышинной модели кислотного аспирационного повреждения, Weiser M.R. et al., *J. Appl. Physiol.* 83(4): 1090-1095, 1997 было продемонстрировано, что мыши с C3-нокаутом были защищены от серьезных повреждений, тогда как мыши с C4-нокаутом не имели такой защиты, что указывает на то, что активация комплемента опосредуется альтернативным путем. Следовательно, предполагается, что блокирование альтернативного пути ингибиторами LEA-1 будет давать терапевтический эффект при лечении аспирационной пневмонии.

Таким образом, ингибиторы LEA-1 и LEA-2 могут давать независимый терапевтический эффект при аспирационной пневмонии. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом или могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения аспирационной пневмонии путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество MASP-1-ингибирующего агента, MASP-3-ингибирующего агента или комбинации MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему таким состоянием или другой пневмонией, опосредуемой комплементом. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена местно в легкие, например путем ингаляции. Альтернативно, MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возмож-

но, путем перорального введения. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести аспирационной пневмонии, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему аспирационной пневмонией, или индивидууму с риском развития такого заболевания. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести аспирационной пневмонии, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему аспирационной пневмонией, или индивидууму с риском развития такого заболевания. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу, включающему ингибирование LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести аспирационной пневмонии, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, страдающему аспирационной пневмонией. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении или ослаблении аспирационной пневмонии по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и/или MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести аспирационной пневмонии у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как аспирационная пневмония.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего аспирационной пневмонией или индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые

связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития аспирационной пневмонии, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

L. Роль MASP-3 в развитии эндофтальмита и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Эндофтальмит представляет собой воспалительное заболевание внутриглазных полостей и, обычно вызывается инфекцией. Эндофтальмит может быть эндогенным и возникает в результате гематогенного распространения микроорганизмов из отдаленного источника инфекции (например, эндокардит), или экзогенным в результате прямой инокуляции организма извне как осложнение хирургической операции на глазах, попадания чужеродных тел, и/или тупой или проникающей глазной травмы. Экзогенный эндофтальмит встречается гораздо чаще, чем эндогенный, и в большинстве случаев он вызывается хирургической операцией на глазах. В Соединенных Штатах, операции по удалению катаракты являются главной причиной эндофтальмита, и такое заболевание развивается у 0,1-0,3% пациентов после такой операции, причем за последнее десятилетие число таких случаев увеличивается (Taban M. et al., Arch. Ophthalmol. 123:613-620, 2005). Послеоперационный эндофтальмит может наблюдаться либо в острой форме, в течение 2 недель после операции, либо с задержкой в несколько месяцев после операции. Острые эндофтальмиты обычно проявляются болью, покраснением, отеком века и снижением остроты зрения. Замедленное начало эндофтальмита бывает реже, чем острая форма, и пациенты с таким заболеванием могут сообщать лишь об умеренной боли и светочувствительности. Лечение эндофтальмита зависит от причины его развития и может включать прием антибиотиков системно и/или интравитреально. Эндофтальмит может приводить к снижению или к потере зрения.

Как было описано ранее для ВДЖП, множество генов пути комплемента ассоциируются с глазными болезнями, и такими генами, в частности, являются гены лектинового пути. Так, например, MBL2 был идентифицирован в случае ВДЖП определенных подтипов (Dinu V. et al., Genet. Epidemiol. 31: 224-37, 2007). Пути LEA-1 и LEA-2, вероятно, участвуют в развитии воспалительных глазных болезней, таких как эндофтальмит (Chow S.P. et al., Clin. Experiment. Ophthalmol. 39:871-7, 2011). Chow и др. исследовали уровни MBL у пациентов с эндофтальмитом и показали, что уровни MBL и функциональная активность лектинового пути значительно повышаются при глазных воспалениях у человека, но практически не детектируются в невоспаленных глазах у контроля. Это свидетельствует об определенной роли MBL и лектинового пути в развитии воспалительных глазных болезней, которые могут приводить к потере зрения, а в частности, к эндофтальмиту. Кроме того, у мышинной модели грибкового кератита роговицы, ген MBL-A является одним из пяти генов, ответственных за активацию воспалительного пути (Wang Y. et al., Mol. Vis. 13: 1226-33, 2007).

Таким образом, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 могут давать независимый терапевтический эффект при лечении эндофтальмита. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом или могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести эндофтальмита, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему эндофтальмитом, или индивидууму с риском развития эндофтальмита. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена местно в глаза, например, путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения непептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-

зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести эндофтальмита, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему эндофтальмитом, или индивидууму с риском развития эндофтальмита. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу, включающему ингибирование LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести эндофтальмита, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, страдающему эндофтальмитом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести эндофтальмита по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму местно в глаза, например, путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неопептидергических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и/или MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести эндофтальмита у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как эндофтальмит.

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего эндофтальмитом, или индивидуума с риском развития эндофтальмита, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития эндофтальмита, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

М. Роль MASP-3 в развитии нейромиелита зрительного нерва и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Нейромиелит зрительного нерва (НЗН) представляет собой аутоиммунное заболевание, которое поражает зрительные нервы и спинной мозг. Это приводит к воспалению зрительного нерва, известному как нейрит зрительного нерва, и спинного мозга, известного как миелит. Повреждения спинного мозга при НЗН могут вызывать слабость или паралич ног или рук, слепоту, дисфункцию мочевого пузыря и

кишечника и сенсорную дисфункцию.

НЗН имеет некоторое сходство с рассеянным склерозом (РС), поскольку оба они вызываются иммунной атакой мишеней ЦНС и приводят к демиелинизации (Papadopoulos and Verkman, *Lancet Neurol.*, 11(6):535-44, 2013). Однако при НЗН, молекулярные мишени, способы лечения и характер поражений отличаются от таковых при РС. РС опосредуется, главным образом, Т-клетками, а у пациентов с НЗН обычно присутствуют антитела, нацеленные на связанный с водой канальный белок аквапорин 4 (AQP4), т.е. белок, присутствующий в астроцитах, которые окружают гематоэнцефалический барьер. Лечение интерфероном-бета является одним из самых широко применяемых методов лечения РС, однако, он может часто давать побочные эффекты при лечении НЗН. Воспалительные поражения при НЗН наблюдаются в спинном мозге и в зрительном нерве, но могут переходить и на головной мозг, включая белое и серое вещество. Демиелинизация, которая наблюдается в случае повреждений при НЗН, опосредуется комплексом (Papadopoulos and Verkman, *Lancet Neurol.*, 11 (6):535-44, 2013).

Комплемент-зависимая цитотоксичность, очевидно, является главным механизмом, вызывающим НЗН. Более 90% пациентов с НЗН имеют антитела IgG против AQP4 (Jarius and Wildemann, Jarius S., Wildemann B., *Nat. Rev. Neurol.* 2010 Jul; 6 (7): 383-92). Эти антитела инициируют повреждения в гематоэнцефалическом барьере. Исходный комплекс антиген-антитело-AQP4/IgG на поверхности астроцитов активирует классический путь комплемента. Это приводит к образованию мембраноатакующего комплекса на поверхности астроцитов, что приводит к инфильтрации гранулоцитов, к демиелинизации и, в конечном счете, к некрозу астроцитов, олигодендроцитов и нейронов (Misu et al., *Acta Neuropathol.* 125(6):815-27, 2013). Эти клеточные события находят свое отражение в разрушении ткани и образовании кист и некротических поражений.

Классический путь комплемента, безусловно, играет критическую роль в патогенезе НЗН. Поражения при НЗН указывают на осаждение иммуноглобулина в сосудодвигательной системе и на активацию компонентов комплемента (Jarius et al., *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4(4):202-14, 2008). Кроме того, белки комплемента, такие как C5a, были выделены из спинномозговой жидкости пациентов с НЗН (Kuroda et al., *J. Neuroimmunol.*, 254(1-2):178-82, 2013). Кроме того, сывороточный IgG, полученный от пациентов с НЗН, может вызывать комплемент-зависимую цитотоксичность у мышей с моделью НЗН (Saadoun et al., *Brain*, 133 (Pt 2):349-61, 2010). Моноклональное антитело против C1q предотвращает опосредуемую комплементом деструкцию астроцитов и поражения у мышей с моделью НЗН (Phuan et al., *Acta Neuropathol.*, 125(6):829-40, 2013).

Альтернативный путь комплемента служит для усиления общей активности комплемента. Harboe и др. (2004) показали, что селективное блокирование альтернативного пути более чем на 80% ингибирует образование мембраноатакующего комплекса, индуцированное по классическому пути (Harboe et al., *Clin. Exp. Immunol.* 138 (3): 439-46, 2004). Tüzün и др. (2013) исследовали продукты классического и альтернативного пути у пациентов с НЗН (Tüzün E. et al., *J. Neuroimmunol.* 233(1-2): 211-5, 2011). C4d, т.е. продукт разложения C4, оценивали на активность классического пути, и было определено, что уровень этого продукта в сыворотке пациентов с НЗН был выше, чем у контроля (в 2,14 раза). Кроме того, у пациентов НЗН наблюдалось увеличение уровня фактора Bb, т.е. продукта расщепления фактора В альтернативного пути, по сравнению с пациентами с РС или с нормальными контрольными индивидами (т.е. увеличение в 1,33 раза). Это говорит о том, что функция альтернативного пути также усиливается при НЗН. Предполагалось, что такая активация будет повышать общую активацию комплемента, и действительно, уровень sC5b-9, т.е. уровень конечного продукта каскада реакций комплемента, был значительно увеличен (в 4,14 раза).

Предполагается, что специфические ингибиторы MASP-3 будут давать эффект при лечении пациентов, страдающих НЗН. Как было показано в настоящем описании, сыворотка без MASP-3 не может активировать фактор В, т.е. главный компонент C5-конвертазы, или фактор D, центральный активатор альтернативного пути. Поэтому блокирование активности MASP-3 ингибирующим агентом, таким как антитело или небольшая молекула, предположительно, также будет ингибировать активацию фактора В и фактора D. Ингибирование этих двух факторов будет прекращать амплификацию альтернативного пути, в результате чего будет снижаться общая комплемента активность. Таким образом, ингибирование MASP-3 позволит значительно улучшить результаты лечения НЗН.

Таким образом, предполагается, что ингибиторы LEA-1 и LEA-2 могут давать независимый терапевтический эффект при лечении НЗН. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом и могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ос-

лабления тяжести НЗН, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом носителе, индивидууму, страдающему НЗН, или индивидууму с риском развития НЗН. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена местно в глаза, например, путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести НЗН, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему НЗН, или индивидууму с риском развития НЗН. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу, включающему ингибирование LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести НЗН, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, страдающему НЗН.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести НЗН по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму местно в глаза, например путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и/или MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести НЗН у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как нейромиеелит зрительного нерва (НЗН).

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего нейромиеелитом зрительного нерва (НЗН), или индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути в целях лечения или снижения риска развития нейромиеелита зрительного нерва (НЗН), где ука-

званное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

N. Роль MASP-3 в развитии болезни Бехчета и способы терапии с использованием MASP-3-ингибирующих антител, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами.

Болезнь Бехчета или синдром Бехчета является редким иммуноопосредуемым системным васкулитом небольших сосудов, который часто сопровождается изъязвлениями слизистой оболочки и болезнями глаз. Болезнь Бехчета (ББ) была названа в 1937 году по имени турецкого дерматолога Хулуси Бехчета, который первым описал тройной симптомокомплекс рецидивирующих язв в ротовой полости, язв в гениталиях и увеита. ББ является системным рецидивирующим воспалительным расстройством неизвестной этиологии. Воспалительный периваскулит при ББ может поражать желудочно-кишечный тракт, легкие, скелетно-мышечную систему, сердечно-сосудистую систему и нервную систему. ББ может приводить к летальному исходу из-за разрыва сосудистой аневризмы или тяжелых неврологических осложнений. Невропатия и атрофия зрительного нерва могут возникать в результате васкулита и закупорки сосудов, питающих зрительный нерв. См. Al-Araji A. et al., *Lancet Neurol.*, 8 (2):192-204, 2009.

ББ наиболее часто встречается в регионах Ближнего Востока и Дальнего Востока, но редко встречается в Европе и в Северной Америке. Вначале ББ часто поддается лечению кортикостероидами и иммунодепрессантами, но известно много случаев рецидивов, приводящих к тяжелому заболеванию и летальному исходу. Было показано, что в некоторых случаях могут быть эффективными биологические агенты, включая интерферон-альфа, IVIG, анти-TNF антитело, анти-IL-6 антитело и анти-CD20 антитело, однако, не существует какого-либо единого мнения о более эффективной терапии.

Хотя известно, что ББ является воспалительным заболеванием, однако, его патобиология пока не ясна. Исследования по генетическим ассоциациям с HLA-антигенами и широкие исследования по геномным ассоциациям выявили участие множества генов цитокинов (Kirino et al., *Nat Genet.*, 45(2):202-7, 2013). Гиперактивность иммунной системы, очевидно, регулируется системой комплемента. Повышенные уровни C3 наблюдались в сыворотке пациентов с ББ (Bardak and Aridogan, *Ocul Immunol. Inflamm* 12(1):53-8, 2004), и повышенные уровни C3 и C4 в спинномозговой жидкости коррелировали с этим заболеванием (Jongen et al., *Arch Neurol*, 49 (10):1075-8, 1992).

Tüzün и др. (2013) исследовали продукты классического и альтернативного пути в сыворотке пациентов с ББ (Tüzün E. et al., *J. Neuroimmunol.* 233(1-2): 211-5, 2011). 4d, т.е. продукт разложения C4, продуцируется в каскаде реакций выше альтернативного пути, и этот продукт оценивали на исходную активность классического пути. Уровень C4d в сыворотке пациентов с ББ был выше, чем у контроля (в 2,18 раза). Фактор Bb представляет собой продукт расщепления фактора В, и этот продукт оценивали на активность альтернативного пути. У пациентов с ББ наблюдалось повышение уровня фактора Bb по сравнению с нормальным контролем (т.е. увеличение в 2,19 раза), что соответствовало усилению функции альтернативного пути при ББ. Поскольку альтернативный путь комплемента служит для амплификации общей активности комплемента, то предполагается, что такая активация будет усиливать общую активность комплемента. Harboe и др. (2004) показали, что селективная блокада альтернативного пути более чем на 80% ингибирует образование мембраноатакующего комплекса, индуцированного по классическому пути (Harboe M. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 138 (3): 439-46, 2004). Действительно, sC5b-9, т.е. конечный продукт каскада реакций комплемента, был значительно увеличен (в 5,46 раза) у пациентов с ББ. Специфические ингибиторы MASP-3 будут давать эффект при лечении ББ. Блокирование MASP-3 должно ингибировать активацию фактора В и фактора D. Это будет приводить к прекращению амплификации альтернативного пути, в результате чего будет снижаться общая активность комплемента. Таким образом, ингибирование MASP-3 позволит значительно улучшить результаты лечения ББ. А поэтому предполагается, что ингибиторы LEA-1 и/или LEA-2 могут давать независимый терапевтический эффект при лечении ББ. Кроме того, ингибиторы LEA-1 и LEA-2, используемые в комбинации друг с другом, могут давать аддитивный терапевтический эффект по сравнению с любым отдельно взятым агентом или могут обеспечивать эффективное лечение подгрупп пациентов широкого ряда. Комбинированное ингибирование LEA-1 и LEA-2 может быть осуществлено путем совместного введения LEA-1-блокирующего агента и LEA-2-блокирующего агента. Оптимально, LEA-1- и LEA-2-ингибирующей функцией может обладать одна молекула, такая как биспецифическое антитело, состоящее из MASP-1/3- и MASP-2-специфического сайта связывания, или антитело с двойной специфичностью, где каждый сайт связывания может связываться с MASP-1/3 или MASP-2 и блокировать эти белки.

В соответствии с вышесказанным, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-1-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести ББ, где указанный способ включает введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество LEA-1-ингибирующего агента, включая MASP-1-ингибирующий агент, MASP-3-ингибирующий агент или комбинацию MASP-1/3-ингибирующих агентов в фармацевтическом

носителе, индивидууму, страдающему ББ, или индивидууму с риском развития ББ. MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующая композиция может быть введена местно в глаза, например путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения, профилактики или ослабления тяжести ББ, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента индивидууму, страдающему ББ, или индивидууму с риском развития ББ. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу, включающему ингибирование LEA-1- и LEA-2-зависимой активации комплемента для лечения или ослабления тяжести ББ, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MASP-2-ингибирующего агента и MASP-1-, MASP-3- или MASP-1/3-ингибирующего агента индивидууму, страдающему ББ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает ингибирование LEA-1-зависимой активации комплемента и LEA-2-зависимой активации комплемента. Как подробно описано выше, предполагается, что применение комбинации фармакологических агентов, которые по отдельности блокируют LEA-1 и LEA-2, будет давать улучшенный терапевтический результат при лечении, профилактике или ослаблении тяжести ББ по сравнению с ингибированием только LEA-1. Этот результат может быть достигнут, например, путем совместного введения антитела, которое обладает LEA-1-блокирующей активностью, вместе с антителом, которое обладает LEA-2-блокирующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения LEA-1- и LEA-2-блокирующие активности объединены в одну молекулу, и такая молекула будет обладать комбинированной LEA-1- и LEA-2-блокирующей активностью. Такая молекула может включать биспецифическое антитело или состоять из биспецифического антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Альтернативно, такая молекула может состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2. Такая молекула может оптимально состоять из биспецифического моноклонального антитела, где один антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-1 и MASP-3 и, таким образом, блокирует LEA-1, а второй антигенсвязывающий сайт специфически распознает MASP-2 и блокирует LEA-2.

MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму местно в глаза, например путем орошения или местного введения композиции в виде геля, мази или капель, или путем введения в стекловидное тело. Альтернативно, MASP-2-ингибирующий агент может быть введен индивидууму системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, интраназально, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения неспецифических агентов. Введение может быть проведено повторно в соответствии с назначением врача до тех пор, пока такое состояние не будет устранено или купировано.

Применение MASP-3-ингибирующих композиций и/или MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-2- и/или MASP-3-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения, профилактики или ослабления тяжести ББ у индивидуума, нуждающегося в этом. Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения индивидуума, нуждающегося в этом.

Как описано здесь в примерах 11-21, были получены высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые обладают терапевтической эффективностью при ингибировании альтернативного пути в случае АП-связанных заболеваний или состояний, таких как болезнь Бехчета (ББ).

В соответствии с этим, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего болезнью Бехчета (ББ), или индивидуума с риском развития такого заболевания, где указанный способ включает введение эффективного количества описанного здесь высокоаффинного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим MASP-3 и ингибируют активацию комплемента альтернативного пути, в целях лечения или снижения риска развития болезни Бехчета (ББ), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают: (a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 275, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259, (ii) VLCDR2, вклю-

чающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

MASP-3 Ингибирующее агенты.

Обнаружение того факта, что лектиновый путь комплемента состоит из двух основных цепей активации комплемента, LEA-1 и LEA-2, и что этот путь представляет собой лектин-независимый путь активации комплемента, указывает на то, что было бы весьма желательно специфически ингибировать один или более этих эффекторных цепей, которые вызывают заболевание, ассоциированное с активацией альтернативного пути комплемента, например по меньшей мере одно из таких заболеваний, как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП), включая мокрую и сухую ВДЖП), ишемическо-реперфузионное повреждение, артрит, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботическая микроангиопатия (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) или ассоциированную с трансплантатом ТМА), астма, болезнь плотных отложений, олигоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит, черепно-мозговая травма, аспирационная пневмония, эндофтальмит, нейромиелит зрительного нерва, болезнь Бехчета, рассеянный склероз (РС), синдром Гийена-Барре, болезнь Альцгеймера, амилотрофический боковой склероз (АБС), волчаночный нефрит, системная красная волчанка (СКВ), диабетическая ретинопатия, увеит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатия, отторжение трансплантата, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализ, сепсис, синдром системного воспалительного ответа (СВО), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), ANCA-васкулит, антифосфолипидный синдром, атеросклероз, IgA-нефропатия и тяжелая миастения, без полной элиминации способности комплемента к иммунной защите (т.е. с сохранением интактного классического пути). Это позволит сохранить C1q-зависимую систему активации комплемента в интактном виде для улучшения процессинга иммунных комплексов и для усиления защиты хозяина от инфекции.

Композиции для ингибирования LEA-1-опосредованной активации комплемента.

Как описано в настоящей заявке, авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что активация LEA-1, приводящая к лизису, является MASP-3-зависимой. Как дополнительно описано в настоящей заявке, в физиологических условиях, MASP-3-зависимая активация LEA-1 также способствует опсонизации, обеспечивая, тем самым, аддитивный эффект вместе с LEA-2-опосредованной активацией комплемента. Как продемонстрировано в настоящей заявке, в присутствии Ca^{++} , фактора D не требуется, поскольку MASP-3 может индуцировать активацию LEA-1 в сыворотке без фактора D. MASP-3, MASP-1 и HTRA-1 способны превращать про-фактор D в активный фактор D. Аналогичным образом, активация MASP-3, во многих случаях зависит от MASP-1, так как MASP-3 (в отличие от MASP-1 и MASP-2) не является аутоактивирующим ферментом и не способен превращаться в активную форму без помощи MASP-1 (Zundel S. et al., J. Immunol. 172: 4342-4350 (2004); Megyeri et al., J. Biol. Chem. 288:8922-8934 (2013)). Поскольку MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом и во многих случаях для превращения в ферментативно активную форму, ему требуется активность MASP-1, то MASP-3-опосредованная активация C3-конвертазы C3Bb альтернативного пути может либо ингибироваться путем нацеливания на зимоген MASP-3 или уже активированный MASP-3, либо путем нацеливания на MASP-1-опосредованную активацию MASP-3, или на то и другое, поскольку во многих случаях в отсутствии функциональной активности MASP-1, MASP-3 остается в форме зимогена и не способен инициировать LEA-1 посредством прямого продуцирования C3-конвертазы (C3bBbC3bBb) альтернативного пути.

Таким образом, в одном из аспектов настоящего изобретения, предпочтительным компонентом белка для разработки терапевтических средств, специфически ингибирующих LEA-1, является ингибитор MASP-3 (включая ингибиторы MASP-1-опосредованной активации MASP-3 (например, ингибитор MASP-1, который ингибирует активацию MASP-3)).

В соответствии с вышеизложенным, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам ингибирования побочных эффектов LEA-1 (т.е. гемолиза и опсонизации) путем введения MASP-3-ингибирующего агента, такого как MASP-3-ингибирующее антитело у индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, или у индивидуума с риском развития заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амилотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении, где указанный способ включает введе-

ние индивидууму фармацевтической композиции, содержащей количество MASP-3-ингибирующего агента, эффективное для ингибирования MASP-3-зависимой активации комплемента, и фармацевтически приемлемый носитель.

MASP-3-ингибирующие агенты вводят в количестве, эффективном для ингибирования MASP-3-зависимой активации комплемента у живого индивидуума, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), возрастной дегенерацией желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионным повреждением, артритом, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, тромботической микроангиопатией (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмой, болезнью плотных отложений, олигоиммунным некротизирующим серповидным гломерулонефритом, черепно-мозговой травмой, аспирационной пневмонией, эндофтальмитом, нейромиелитом зрительного нерва, болезнью Бехчета, рассеянным склерозом, синдромом Гийена-Барре, болезнью Альцгеймера, амиотрофическим боковым склерозом (АБС), волчаночным нефритом, системной красной волчанкой (СКВ), диабетической ретинопатией, увеитом, хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатией, отторжением трансплантата, болезнью "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемо-диализом, сепсисом, синдромом системного воспалительного ответа (СВО), острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), ANCA-васкулитом, антифосфолипидным синдромом, атеросклерозом, IgA-нефропатией и тяжелой миастенией, или индивидуума с риском развития указанных заболеваний. В соответствии с этим аспектом изобретения, репрезентативными MASP-3-ингибирующими агентами являются молекулы, которые ингибируют биологическую активность MASP-3, включая молекулы, которые ингибируют по меньшей мере, одну или более из следующих функций: MASP-3-зависимой активации фактора В лектинового пути, MASP-3-зависимой активации про-фактора D лектинового пути, MASP-3-зависимой и лектин-независимой активации фактора В и MASP-3-зависимой и лектин-независимой активации про-фактора D (такого как низкомолекулярные ингибиторы, анти-MASP-3 антитела и их фрагменты, или блокирующие пептиды, которые взаимодействуют с MASP-3 или ингибируют белок-белковое взаимодействие), и молекулы, которые снижают уровень экспрессии MASP-3 (такие как антисмысловые молекулы нуклеиновой кислоты MASP-3, MASP-3-специфические молекулы РНКи и рибозимы MASP-3). MASP-3-ингибирующий агент может эффективно блокировать белок-белковые взаимодействия MASP-3, препятствовать димеризации или сборке MASP-3, блокировать связывание с Ca^{++} , блокировать активный центр сериновой протеазы MASP-3 или снижать уровень экспрессии белка MASP-3, и, тем самым, предотвращать LEA-1-опосредованную или лектин-независимую активацию комплемента MASP-3. MASP-3-ингибирующие агенты могут быть использованы отдельно в качестве первичной терапии или в комбинации с другими терапевтическими средствами в качестве адъювантной терапии для усиления терапевтического эффекта лечения другими лекарственными средствами, как подробно описано в настоящей заявке.

Высокоаффинные моноклональные MASP-3-ингибирующие антитела.

Как описано здесь в примерах 11-21, и систематизировано ниже в табл. 2А, 2В и 3, авторами настоящего изобретения были неожиданно получены высокоаффинные (т.е. ≤ 500 пМ) MASP-3-ингибирующие антитела, которые связываются с эпитопом в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3. Как описано в настоящей заявке, авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что эти высокоаффинные анти-MASP-3 антитела способны ингибировать активацию альтернативного пути комплемента в сыворотке крови человека, грызунов и приматов, не являющихся человеком. Вариабельные области легкой и тяжелой цепи этих антител были секвенированы, выделены и проанализированы в формате Fab и полноразмерного IgG. Как описано в примере 15, и как показано на дендрограммах, изображенных на фиг. 50А и 50В, антитела могут быть сгруппированы в соответствии со сходством их последовательностей. Краткое описание вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи этих антител приводится на фиг. 49А и 49В и представлены ниже в табл. 2А и 2В. Были получены гуманизированные варианты репрезентативных высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител, как описано в примере 19 и систематизировано в табл. 3.

Таблица 2А. Последовательности высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител: мышинных родительских

Эталонное анти-MASP-3 антитело	Группа	Вариабельная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи (аминокислоты)	Вариабельная область тяжелой цепи (ДНК)	Вариабельная область легкой цепи
--------------------------------	--------	-----------------------------------	---	---	----------------------------------

No		(аминокислоты)	)		цепи (ДНК)
4D5	IA	SIN:24	SIN:40	SIN:217	SIN:233
1F3	IA	SIN:25	SIN:41	SIN:218	SIN:234
4B6	IA	SIN:26	SIN:42	SIN:219	SIN:235
1A10	IA	SIN:27	SIN:42	SIN:220	SIN:235
10D12	IB	SIN:28	SIN:43	SIN:221	SIN:236
35C1	IB	SIN:29	SIN:44	SIN:222	SIN:237
13B1	IC	SIN:30	SIN:45	SIN:223	SIN:238
1G4	II	SIN:31	SIN:46	SIN:224	SIN:239
1E7	IIIA	SIN:32	SIN:47	SIN:225	SIN:240
2D7	IIIA	SIN:33	SIN:48	SIN:226	SIN:241
49C11	IIIA	SIN:34	SIN:49	SIN:227	SIN:242
15D9	IIIB	SIN:35	SIN:50	SIN:228	SIN:243
2F5	IIIB	SIN:36	SIN:51	SIN:229	SIN:244
1B11	IIIC	SIN:37	SIN:52	SIN:230	SIN:245
2F2	IIID	SIN:38	SIN:53	SIN:231	SIN:246
11B6	IIID	SIN:39	SIN:54	SIN:232	SIN:247

Примечания: "SIN" означает "SEQ ID NO:"

Таблица 2В. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела:CDR

Эталонное анти-MASP-3 антитело No	Вариабельная область тяжелой цепи (аминокислоты)	Вариабельная область легкой цепи (аминокислоты)	Тяжелая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Легкая цепь: CDR1;CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
4D5	SIN:24	SIN:40	56;58;60	142;144;146
1F3	SIN:25	SIN:41	62;63;65	149;144;146
4B6	SIN:26	SIN:42	62;67;65	149;144;146
1A10	SIN:27	SIN:42	62;69;65	149;144;146
10D12	SIN:28	SIN:43	72;74;76	153;155;157
35C1	SIN:29	SIN:44	79;74;82	159;155;160
13B1	SIN:30	SIN:45	84;86;88	142;144;161
1G4	SIN:31	SIN:46	91;93;95	163;165;167
1E7	SIN:32	SIN:47	109;110;112	182;184;186
2D7	SIN:33	SIN:48	125;127;129	196;198;200
49C11	SIN:34	SIN:49	132;133;135	203;165;204
15D9	SIN:35	SIN:50	137;138;140	206;207;208
2F5	SIN:36	SIN:51	98;99;101	169;171;173
1B11	SIN:37	SIN:52	103;105;107	176;178;180
2F2	SIN:38	SIN:53	114;116;118	188;178;190
11B6	SIN:39	SIN:54	114;121;123	191;178;193

Таблица 3. Репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела: гуманизированные и модифицированные антитела для удаления сайтов посттрансляционной модификации

Эталонное анти-MASP-3 антитело No	Вариабельная область тяжелой цепи, а.к. (SEQ ID NO)	Вариабельная область легкой цепи а.к. (SEQ ID NO)	Тяжелая цепь:: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Легкая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
Родительское 4D5	24	40	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1	248	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-19-1	249	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1-NA	248	278	56;58;60	258;144;146
h4D5-19-1-NA	249	278	56;58;60	258;144;146
Родительское 10D12	28	43	72;74;76	153;155;157
h10D12-45-21	251	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-49-21	252	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-45-21- GA	251	279	72;74;76	263;155;157
h10D12-49-21- GA	252	279	72;74;76	263;155;157
Родительское 13B1	30	45	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1	254	256	84;275;88	142;144;161
h13B1-10-1	255	256	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1-NA	254	280	84;275;88	258;144;161
h13B1-10-1-NA	255	280	84;86;88	258;144;161

Соответственно, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2) с высокой аффинностью (имеющей K_D менее чем 500 пМ), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активацию комплемента альтернативного пути. В некоторых вариантах осуществления изобретения высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют альтернативный путь при молярном отношении MASP-3-мишень:mAb приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 у млекопитающего.

Ингибирование активации комплемента альтернативного пути характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения: ингибирования гемолиза и/или опсонизации; ингибирования лектин-независимого превращения фактора В; ингибирование лектин-независимого превращения фактора D, ингибирования субстрат-специфического расщепления сериновой протеазой MASP-3; снижения степени гемолиза или уменьшения степени расщепления C3 и осаждения C3b на поверхности; уменьшения степени осаждения факторов В и Bb на активирующей поверхности; снижения остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментального добавления активирующей поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; снижения уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активирующую поверхность; и/или продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a.

Так, например, как описано в настоящей заявке, высокоаффинными MASP-3-ингибирующими антителами являются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные ингибировать созревание фактора D (т.е. расщепление про-фактора D с образованием фактора D) у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела способны ингибировать созревание фактора D в полной сыворотке до уровня менее чем 50%, чем это наблюдается в необработанной контрольной сыворотке (например, менее чем 40%, например, менее чем

30%, например, менее чем 25%, например, менее чем 20%, например, менее чем 15%, например, менее чем 10%, например, менее чем 5% по сравнению с необработанной контрольной сывороткой, которая не контактировала с MASP-3-ингибирующим антителом).

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела селективно ингибируют альтернативный путь, в результате чего C1q-зависимая система активации комплемента остается функционально интактной.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или оба полипептида тяжелой и легкой цепи любых описанных здесь MASP-3-ингибирующих антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Настоящее изобретение также относится к вектору (например, клонирующему или экспрессионному вектору), содержащему нуклеиновую кислоту, и к клетке (например, к клетке насекомого, бактерий, грибов или млекопитающих), содержащей этот вектор. Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования любых описанных здесь MASP-3-ингибирующих антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти способы включают получение клетки, содержащей экспрессионный вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или оба полипептида тяжелой и легкой цепи любых описанных здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Клетку или клеточную культуру культивируют в условиях и в течение времени, достаточных для экспрессии в клетке (или в клеточной культуре) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Указанный способ может также включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или клеточной культуры) или из среды для культивирования клетки или клеток.

Эпитопы и пептиды MASP-3.

Как описано в примере 18, показано на фиг. 62 и систематизировано ниже в табл. 4, было обнаружено, что высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению специфически распознают один или более эпитопов в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2). Термин "специфически распознает" означает, что антитело связывается с указанным эпитопом со значительно более высокой аффинностью, чем с любой другой молекулой или ее частью.

Таблица 4. Репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела: эпитоп-связывающие области MASP-3 (см. также фиг. 62)

Пептид-связывающие фрагменты (эпитопы) в эталонном человеческом MASP-3 (с лидерной последовательностью)	Анти-MASP-3 mAb Рег. No.
⁴⁹⁸ VLRQRRD ^{TTVI} ₅₀₉ (SIN:9)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12,
⁴⁹⁴ TAAHVLRQRRD ^{TTV} ₅₀₈ (SIN:10)	13B1
⁵⁴⁴ DFNIQYNH ^{DIALVQ} ₅₅₈ (SIN:11)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
⁶²⁶ PHAECKTSY ^{ESRS} ₆₃₈ (SIN:12)	13B1
⁶³⁹ GNYSVTEN ^{MFC} ₆₄₉ (SIN:13)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
⁷⁰⁴ VSNYVDW ^{VWE} ₇₁₃ (SIN:14)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
⁴⁹⁸ VLRQRRD ^{TTV} ₅₀₈ (SIN:15) Коровая последовательность Группы I	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12, 13B1
⁴³⁵ ECGQPSR ^{SLPSLV} ₄₄₇ (SIN:16)	1B11
⁴⁵⁴ RNAEGL ^{FPWQ} ₄₆₄ (SIN:17) Коровая последовательность Групп II и III	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11
⁴⁷⁹ KWFGSGALL ^{SASWIL} ₄₉₃ (SIN:18)	15D9, 2F5
⁵¹⁴ EHVT ^{VYLGLH} ₅₂₃ (SIN:19)	1E7, 2D7, 1G4
⁵⁶² PVPLG ^{PHVMP} ₅₇₁ (SIN:20)	15D9, 2F5
⁵⁸³ APHML ^{GL} ₅₈₉ (SIN:21)	1B11
⁶¹⁴ SDVL ^{QYVKLP} ₆₂₃ (SIN:22)	1B11
⁶⁶⁷ AFVIFDD ^{LSQRW} ₆₇₈ (SIN:23)	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5

В соответствии с этим в некоторых вариантах осуществления изобретения высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, локализованным в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3, где указанный эпитоп расположен по меньшей мере в одной или более из следующих последовательностей: VLRQRRD^{TTVI}

(SEQ ID NO: 9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO: 10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO: 11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO: 12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO: 13), VSNYVDWVWE (SEQ ID NO: 14) и/или VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 14.

В других вариантах осуществления изобретения высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, локализованным в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3, где указанный эпитоп расположен по меньшей мере в одной или более из следующих последовательностей: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO: 16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO: 17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID NO: 18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO: 20); APHMLGL (SEQ ID NO: 21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO: 22); и/или AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 17. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19) и/или AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и/или SEQ ID NO: 23. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 21 и/или SEQ ID NO: 22.

Области CDR.

В одном из аспектов настоящего изобретения, антитело или его функциональный эквивалент содержат специфические гипервариабельные области, обозначенные CDR. Предпочтительно, CDR представляют собой CDR в соответствии с определением по Кэбату. CDR, или гипервариабельные области, например, могут быть идентифицированы путем выравнивания последовательностей с другими антителами. Области CDR высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител представлены в табл. 18-23.

mAb Группы IA.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 209 (XXDIN, где X в положении 1 представляет собой S или T и где X в положении 2 представляет собой N или D); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, где X в положении 7 представляет собой G или D; X в положении 8 представляет собой S, T или R; X в положении 9 представляет собой I или T; X в положении 13 представляет собой E или D; X в положении 14 представляет собой K или E; и X в положении 16 представляет собой T или K); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 211 (XEDXY, где X в положении 1 представляет собой L или V, и где X в положении 4 представляет собой T или S); и (b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, где X в положении 8 представляет собой N, I, Q или A; где X в положении 9 представляет собой S или T; и где X в положении 17 представляет собой A или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES), и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 146 (KQSYNLYT). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 56 (TDDIN). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 62 (SNDIN). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 63 (WIYPRDGSIKYNEKFTD). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 67 (WIYPRDGTTKYNEEFTD). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 69 (WIYPRDGTTKYNEKFTD). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 60 (LEDTY). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 65 (VEDSY). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA), SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); или SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA). В одном из вариантов осуществ-

вления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 149 (KSSQSLLISRTRKNYLS).

В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 56, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 58, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 60 и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259; LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 144, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 146.

В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 62, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 69, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 65 и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 149, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 144, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 146.

mAb Группы IB.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) варибельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 213 (SYGXX, где X в положении 4 представляет собой M или I, и где X в положении 5 представляет собой S или T); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 74; и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 214 (GGXAXDY, где X в положении 3 представляет собой E или D и где X в положении 5 представляет собой M или L); и (b) варибельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, где X в положении 10 представляет собой D, E или A; где X в положении 11 представляет собой G или A; и где X в положении 16 представляет собой N или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 155; и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 216 (WQGTHFPXT, где X в положении 8 представляет собой W или Y).

В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 варибельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 72 (SYGMS). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 79 (SYGIT). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 76 (GGEAMDY). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 82 (GGDALDY). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 153 (KSSQSLLDSGKTYLN); SEQ ID NO: 261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), SEQ ID NO: 262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) или SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 152. В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 159 (KSSQSLLDSGKTYLS).

В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 160 (WQGTHFPYT). В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 72, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 74, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 76, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262 или SEQ ID NO: 263; LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 155 и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 157.

В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR содержит SEQ ID NO: 72, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 74, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 76, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 263, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 155, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 157.

В одном из вариантов осуществления изобретения HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 79, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 74, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 82, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 159, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 155 и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 160.

mAb Группы IC.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) варибельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и (b) варибельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); или SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES); и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT). В одном из вариантов осуществления изобретения LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 258.

mAb Группы II.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат: (а) варибельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 91 (GYWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 95 (SIDY); и (b) варибельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 165 (KVSNRFS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 167 (SQSTHVPPT).

mAb Группы III.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 109 (RVHFAIRDTNYWMQ), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 112 (GSHYFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 182 (RASQSIGTSH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 184 (YASESIS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 186 (QQSNSWPYT); или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 125 (DYVMN), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 127 (DVNPNNNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 129 (CPFYLLGKGTHFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 198 (YTSRLHS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 200 (QQGFTLPWT); или

(c) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 137, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 138, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 140; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 206, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 207, и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 208; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 98, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 99, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 101; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 169, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 171 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 173; или

(e) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 103, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 105, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 107; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 176, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 116, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 118; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 188, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 190; или

(g) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 121, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 123; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 191, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193; или

(h) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 132, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 133, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 135; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 203, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 165 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 204. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к высокоаффинному MASP-3-ингибирующему антителу, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность или состоящую из последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NO: 24-39, 248-249, 251-252, 254-255, или к антителу, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 254 или SEQ ID NO: 255.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к высокоаффинному MASP-3-ингибирующему антителу, содержащему вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность или состоящую из последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NO: 40-54, 250, 253, 256, 278, 279 или 280, или к антителу, содержащему вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279 или SEQ ID NO: 280.

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-MASP-3 моноклональное антитело включает тяжелую цепь, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249, и легкую цепь, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 250 или SEQ ID NO: 278.

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-MASP-3 моноклональное антитело включа-

Перекрестное конкурентное связывание высокоаффинных анти-MASP-3 антител.

Как описано в настоящей заявке, описанные здесь высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела распознают перекрывающиеся эпитопы в домене сериновой протеазы MASP-3. Как описано в примере 18, показано на фиг. 61A-E и 62-67 и систематизировано в табл. 4 и 28, анализ на перекрестное конкурентное связывание и анализ на связывание Perscan показали, что высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела перекрестно конкурируют за связывание с общими эпитопами, локализованными в домене сериновой протеазы MASP-3. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к высокоаффинным MASP-3-ингибирующим антителам, которые специфически распознают эпитоп или его часть в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3, распознаваемого одним или более антителами, выбранными из группы, состоящей из

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 40;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 41;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 26, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 42;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 42;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 28, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 43;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 44;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 45;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 46;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 47;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 48;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 34, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 49;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 50;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 36, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 51;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 52;

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 53; и

моноклонального антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 54.

В соответствии с настоящим изобретением, если данное антитело распознает по меньшей мере часть эпитопа, распознаваемого другим данным антителом, то считается, что эти два антитела распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы.

Для того чтобы определить, распознает ли антитело (также называемое тестируемым антителом) одинаковые или перекрывающиеся эпитопы для конкретного моноклонального антитела (также называемого эталонным антителом), могут быть проведены различные тесты, известные специалисту в данной области. Предпочтительно, такой анализ включает стадии:

получения MASP-3 или его фрагмента, содержащего эпитоп, распознаваемый эталонным антителом;

добавления тестируемого антитела и эталонного антитела к указанному MASP-3, где тестируемое антитело или эталонное антитело было помечено детектируемой меткой. Альтернативно, оба антитела могут быть помечены различными детектируемыми метками;

детектирования присутствия детектируемой метки в MASP-3;

детектирования для того, чтобы определить может ли тестируемое антитело вытеснять эталонное антитело.

В случае вытеснения эталонного антитела тестируемое антитело распознает одинаковые или перекрывающиеся эпитопы для эталонного антитела. Таким образом, если эталонное антитело было помечено детектируемой меткой, то слабый детектируемый сигнал от MASP-3 указывает на вытеснение эталонного антитела. Если тестируемое антитело было помечено детектируемой меткой, то сильный детектируемый сигнал от MASP-3 указывает на вытеснение эталонного антитела. Фрагмент MASP-3 может быть, предпочтительно, иммобилизован на твердом носителе, что облегчает его обработку. Детектируе-

мая метка может представлять собой любую прямо или опосредованно детектируемую метку, такую как фермент, радиоактивный изотоп, тяжелый металл, окрашенное соединение или флуоресцентное соединение. В примере 18, в разделе "Анализ на конкурентное связывание", приведенном ниже, описан репрезентативный способ определения способности тестируемого антитела распознавать тот же самый эпитоп или перекрывающийся эпитоп, распознаваемый эталонным антителом. Специалист в данной области может легко адаптировать указанный способ к конкретно рассматриваемым антителам.

Анти-MASP-3 антителами, используемыми в этом аспекте изобретения, являются моноклональные или рекомбинантные антитела, полученные от любого антитело-продуцирующего млекопитающего, и такие антитела могут представлять собой мультиспецифические (т.е. биспецифические или триспецифические), химерные, гуманизированные, полностью человеческие, антиидиотипические антитела и их фрагменты. Фрагментами антител являются Fab-, Fab'-, F(ab)₂-, F(ab')₂-, Fv-фрагменты, scFv-фрагменты и одноцепочечные антитела, подробно описанные в настоящей заявке.

Анти-MASP-3 антитела могут быть скринированы на способность ингибировать систему активации комплемента альтернативного пути с помощью описанных здесь анализов. Ингибирование активации комплемента альтернативного пути характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения: ингибирования гемолиза и/или опсонизации; ингибирования лектин-независимого превращения фактора В; ингибирования лектин-независимого превращения фактора D, ингибирования субстрат-специфического расщепления сериновой протеазой MASP-3; снижения степени гемолиза или уменьшения степени расщепления C3 и осаждения C3b на поверхности; уменьшения степени осаждения факторов В и Вb на активирующей поверхности; снижения остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментального добавления активирующей поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; снижения уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активирующую поверхность; и/или продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a.

Анти-MASP-3 антитела с пониженной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах этого аспекта настоящего изобретения, описанные здесь высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела обладают пониженной эффекторной функцией, обеспечивающей снижение воспаления, которое может возникать в результате активации комплемента классического пути. Было показано, что способность молекул IgG запускать комплемент классического пути сохраняется в Fc-части молекулы (Duncan A.R. et al., *Nature* 332:138 740 (1988)). Молекулы IgG, в которых Fc-часть молекулы была удалена путем ферментативного расщепления, не обладают этой эффекторной функцией (см. Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). В соответствии с этим, антитела с пониженной эффекторной функцией могут быть получены путем удаления Fc-части молекулы посредством генетического конструирования последовательности Fc, которая обладает минимальной эффекторной функцией, или имеет либо изотип человеческого IgG₂, либо IgG₄.

Антитела с пониженной эффекторной функцией могут быть получены с помощью стандартной молекулярной биологической манипуляции с использованием Fc-части тяжелых цепей IgG, как описано в публикациях Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10:241 250, (1993) и Rodrigues et al., *J. Immunol.* 151:6954 6961, (1998). Антителами с пониженной эффекторной функцией также являются человеческие антитела изотипов IgG₂ и IgG₄, которые обладают пониженной способностью активировать комплемент и/или взаимодействовать с Fc-рецепторами (Ravetch J.V. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:451 492, (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, специфичные к человеческому MASP-1, MASP-2 или MASP-3 (включая антитела с двойной специфичностью, панспецифические, биспецифические или триспецифические антитела), и состоящие из изотипов IgG₂ или IgG₄, могут быть получены одним из нескольких методов, известных специалистам в данной области, как описано у Vaughan T.J. et al., *Nature Biotechnol.* 16:535 539, (1998).

Продуцирование высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител.

Анти-MASP-3 антитела могут быть получены с использованием полипептидов MASP-3 (например, полноразмерных MASP-3) или с использованием антигенных пептидов, несущих эпитоп MASP-3 (например, часть полипептида MASP-3), например, как описано ниже в примере 14. Иммуногенные пептиды могут иметь по меньшей мере пять аминокислотных остатков. Пептиды и полипептиды MASP-3, используемые для вырабатывания антител, могут быть выделены в виде природных полипептидов или рекомбинантных или синтетических пептидов и каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов. Антигены, используемые для продуцирования анти-MASP-3 антител, также включают гибридные полипептиды, такие как гибриды полипептида MASP-3 или его части с полипептидом иммуноглобулина или с белком, связывающимся с мальтозой. Полипептидным иммуногеном может быть полноразмерная молекула или ее часть. Если часть полипептида является гаптен-подобной, то такая часть может быть преимущественно присоединена к макромолекулярному носителю или связана с этим носителем (таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH), альбумин бычьей сыворотки (BSA) или столбнячный токсин) для

иммунизации.

Моноклональные антитела.

Используемый здесь термин "моноклональный" указывает на тип антитела, полученного, по существу, от гомогенной популяции антител, но этот термин не означает, что данное антитело должно быть получено каким-либо конкретным методом. Моноклональные антитела могут быть получены любым методом продуцирования молекул антител с использованием стабильных клеточных линий в культуре, например гибридным методом, описанным Kohler G. et al., *Nature* 256:495 (1975), или методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567, Cabilly). Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными Clackson T. et al., *Nature* 352:624-628, (1991), и Marks J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991). Такими антителами могут быть иммуноглобулины любого класса, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, и любого подкласса.

Так, например, моноклональные антитела могут быть получены путем введения подходящему млекопитающему (например, мышам BALB/c) композиции, содержащей полипептид MASP-3 или его часть. По истечении заданного периода времени, у мышей берут спленоциты и суспенсируют в среде для культивирования клеток. Затем, спленоциты подвергают слиянию с иммортализованной клеточной линией с образованием гибридомы. Образовавшиеся гибридомы культивируют в клеточной культуре и скринируют на их способность продуцировать моноклональное антитело против MASP-3. (см. также *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, pages 2.5.1 2.6.7, 1991).

Человеческие моноклональные антитела могут быть продуцированы с использованием трансгенных мышей, которые были получены в целях вырабатывания специфических человеческих антител в ответ на стимуляцию антигеном. В этом методе элементы локуса тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина вводят мышам, полученным из эмбриональных стволовых клеточных линий, которые содержат целевые дизрупции эндогенных локусов тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела, специфичные к антигенам человека, таким как описанные здесь антигены MASP-2, и эти мыши могут быть использованы для продуцирования гибридом, секретирующих антитело против человеческого MASP-2, путем слияния В-клеток, взятых у этих животных, с получением подходящих миеломных клеточных линий с применением стандартной технологии Колера-Милстейна. Способы получения человеческих антител от трансгенных мышей описаны, например, 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 могут быть выделены и очищены из гибридных культур с применением различных хорошо разработанных методов. Такие методы выделения включают аффинную хроматографию на белок А-сефарозе, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию (см., например, Coligan, pages 2.7.1 2.7.12 and pages 2.9.1 2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" in *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, 79 104, 1992).

Моноклональные антитела, после их получения, сначала тестируют на специфическое связывание с MASP-3 или, в случае необходимости, на двойное связывание с MASP-1/3, MASP-2/3 или MASP-1/2. Методы определения связывания антитела с белковым антигеном и/или определения аффинности антитела к белковому антигену известны специалистам. Так, например, связывание антитела с белковым антигеном может быть детектировано и/или количественно оценено различными методами, такими как, но не ограничивающимися ими, вестерн-блот-анализ, дот-блот-анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием системы BIAcore; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ), или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). См., например, Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide," W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering," 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; John et al. (1993), *Immunol. Meth.* 160:191-198; Jonsson et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; and Jonsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627. См. также патент США № 6355245.

Аффинность моноклональных анти-MASP-3 антител может быть легко определена средним специалистом в данной области (см., например, Scatchard A., *NY Acad. Sci.* 51:660 672, 1949). В одном варианте осуществления изобретения моноклональные анти-MASP-3 антитела, используемые в способах согласно изобретению, связываются с MASP-3 с аффинностью связывания <100 нМ, предпочтительно <10 нМ, предпочтительно <2 нМ, а наиболее предпочтительно с высокой аффинностью, составляющей <500 пМ.

После идентификации антител, которые специфически связываются с MASP-3, антитела против MASP-3 тестируют на их способность функционировать в качестве ингибитора альтернативного пути в одном из нескольких функциональных анализов, таких как, например, анализ на ингибирование активации комплемента альтернативного пути, которое характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, образующихся в результате введения высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения: ингибирования гемолиза и/или опсонизации; ингибирования лектин-независимого превращения фактора В; ингибирования лектин-независимого превращения фактора D; ингибирования

субстрат-специфического расщепления сериновой протеазой MASP-3; снижения степени гемолиза или уменьшения степени расщепления C3 и осаждения C3b на поверхности; уменьшения степени осаждения факторов В и Bb на активирующей поверхности; снижения остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментального добавления активирующей поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; снижения уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активирующую поверхность; снижения уровня продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Va, Vb, C3b или C3a; и/или снижения степени осаждения фактора P.

Химерные/гуманизированные антитела.

Моноклональные антитела, используемые в способе согласно изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих от конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих от других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител (патент США № 4816567, Cabilly; и Morrison S.L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851 6855, (1984)).

Одна из форм химерного антитела, используемого в настоящем изобретении, представляет собой гуманизированное моноклональное анти-MASP-3 антитело. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую от нечеловеческого иммуноглобулина.

Гуманизированные моноклональные антитела получают путем переноса нечеловеческих (например, мышиных) гипервариабельных областей (CDR) вариабельной области тяжелой и легкой цепи мышиного иммуноглобулина в человеческий вариабельный домен. Затем, остатки человеческих антител обычно заменяют в каркасных областях нечеловеческих аналогов. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в антителе-реципиенте или в донорном антителе. Эти модификации вводят для улучшения свойств антитела. В основном, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все или по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена, в которых все или почти все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или почти все каркасные области Fv представляют собой области последовательности человеческого иммуноглобулина.

Гуманизированное антитело также содержит, но необязательно, по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), а обычно, человеческого иммуноглобулина. Более подробное описание см. 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, используемые в настоящем изобретении, включают человеческие моноклональные антитела, содержащие, по меньшей мере, область CDR3, связывающуюся с MASP-3. Кроме того, Fc-части могут быть заменены так, чтобы они продуцировали IgA или IgM, а также человеческие антитела IgG. Такие гуманизированные антитела будут иметь особое клиническое применение, так как они будут специфически распознавать человеческий MASP-3, но не будут вызывать иммунный ответ у человека против самого антитела. Следовательно, они лучше подходят для введения в организм человека *in vivo*, особенно при повторном или длительном введении.

Методы получения гуманизированных моноклональных антител также описаны, например, в публикациях 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. 12:431, (1992); Singer I.I. et al., J. Immun. 150:2844, (1993); Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., (1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399 434, (1996); и в патенте США № 5693762, Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие предприятия, которые синтезируют гуманизированные антитела из специфических областей мышиных антител, такие как Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела.

Анти-MASP-3 антитела также могут быть получены с применением рекомбинантных методов. Так, например, человеческие антитела могут быть получены с использованием библиотек генов, экспрессирующих человеческие иммуноглобулины (поставляемых, например, от Stratagene, Corp., La Jolla, CA), для получения фрагментов человеческих антител (V_H, V_L, Fv, фактора D, Fab или F(ab')₂). Затем, эти фрагменты используют для конструирования полноразмерных человеческих антител с применением методов, аналогичных методам получения химерных антител.

Фрагменты иммуноглобулина.

MASP-3-ингибирующие агенты, используемые в способе согласно изобретению, включают не только интактные молекулы иммуноглобулина, но также и хорошо известные фрагменты, включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, ScFv-фрагменты, диантитела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические (например, биспецифические и триспецифические) антитела, образованные фрагментами антител.

Специалистам в данной области хорошо известно, что только небольшая часть молекулы антитела,

т.е. паратоп, участвует в связывании антитела с его эпитопом (см., например, Clark W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Области pFc' и Fc антитела являются эффекторами комплемента классического пути, но не участвуют в связывании с антигеном. Антитело, от которого ферментативно отщепляется область pFc', или которое было продуцировано без области pFc', называется F(ab')₂-фрагментом и сохраняет оба антигенсвязывающих сайта интактного антитела. Выделенный F(ab')₂-фрагмент называется двухвалентным моноклональным фрагментом из-за двух антигенсвязывающих сайтов. Аналогичным образом, антитело, от которого ферментативно отщепляется Fc-область, или которое было продуцировано без Fc-области, называется Fab-фрагментом, и сохраняет один из антигенсвязывающих сайтов интактной молекулы антитела.

Фрагменты антител могут быть получены путем протеолитического гидролиза, например путем гидролиза полноразмерных антител пепсином или папаином стандартными методами. Так, например, фрагменты антител могут быть получены путем ферментативного расщепления антител пепсином с образованием фрагмента 5S, обозначаемого F(ab')₂. Этот фрагмент может быть дополнительно расщеплен с использованием тиол-восстанавливающего агента с получением одновалентных 3.5S Fab'-фрагментов. Реакция расщепления может быть проведена, но необязательно, с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые образуются в результате расщепления дисульфидных связей. Альтернативно, ферментативное расщепление пепсином приводит к образованию двух одновалентных Fab-фрагментов и непосредственно Fc-фрагмента. Эти методы описаны, например, в патенте США № 4331647, Goldenberg; Nisonoff A. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, (1960); Porter R.R., *Biochem. J.* 73:119, (1959); Edelman et al., in *Methods in Enzymology* 1:422, Academic Press, (1967); и в публикации Coligan, на стр. 2.8.1 2.8.10 и 2.10 2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, использование фрагментов антител, не содержащих Fc-области, являются предпочтительным для предотвращения активации комплемента классического пути, который инициируется после связывания Fc с рецептором Fcγ. Существует несколько способов, с помощью которых можно продуцировать моноклональное антитело, и при этом избежать взаимодействий с рецептором Fcγ. Так, например, Fc-область моноклонального антитела может быть химически удалена посредством частичного расщепления протеолитическими ферментами (например, такого как расщепление фицином), что позволяет получить, например, антигенсвязывающие фрагменты антитела, такие как Fab- или F(ab)₂-фрагменты (Mariani M. et al., *Mol. Immunol.* 28:69 71, (1991)). Альтернативно, человеческое антитело изотипа IgG γ4, которое не связывается с рецепторами Fcγ, может быть использовано при конструировании гуманизированного антитела, как описано в настоящей заявке. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, не содержащие Fc-домена, могут быть также сконструированы описанными здесь рекомбинантными методами.

Фрагменты одноцепочечных антител.

Альтернативно, могут быть созданы молекулы, связывающиеся с одной пептидной цепью и специфичные к MASP-3, в которых Fv-области тяжелой и легкой цепей являются связанными. Fv-фрагменты могут быть соединены пептидным линкером с образованием одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Эти одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают путем конструирования структурного гена, содержащего последовательности ДНК, кодирующие V_H- и V_L-домены, которые соединены олигонуклеотидом. Структурный ген встраивают в экспрессионный вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как *E.coli*. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют одну полипептидную цепь с линкерным пептидом, который связан мостиковой связью с двумя V-доменами. Методы получения scFv, описаны, например, Whitlow et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, (1991); Bird et al., *Science* 242:423, (1988); патент США № 4946778, Ladner; Pack P. et al., *Bio/Technology* 11:1271 (1993).

В качестве иллюстративного примера, MASP-3-специфический ScFv может быть получен посредством обработки лимфоцитов полипептидом MASP-3 *in vitro* и отбора библиотек для представления антител в фаговых или в аналогичных векторах (например, путем использования иммобилизованного или меченного белка или пептида MASP-3). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные домены, связывающиеся с полипептидом MASP-3, могут быть получены путем рандомизированного скрининга пептидных библиотек, представленных на фage или на бактериях, таких как *E.coli*. Эти рандомизированные библиотеки для представления пептидов могут быть использованы для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с MASP-3. Методы получения и скрининга таких рандомизированных библиотек для представления пептидов хорошо известны специалистам в данной области (патент США № 5223409, Lardner; патент США № 4946778, Ladner; патент США № 5403484, Lardner; патент США № 5571698, Lardner; и Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996), и рандомизированные библиотеки для представления пептидов и наборы для скрининга таких библиотек являются коммерчески доступными и поставляются, например, 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.).

Другая форма фрагмента анти-MASP-3 антитела, используемого в данном аспекте изобретения,

представляет собой пептид, кодирующий одну гипервариабельную область (CDR), которая связывается с эпитопом на антигене MASP-3 и ингибирует активацию комплемента альтернативного пути.

Пептиды CDR ("минимальные распознающие компоненты") могут быть получены путем конструирования генов, кодирующих CDR представляющего интерес антитела. Такие гены получают, например, с помощью полимеразной цепной реакции для синтеза вариабельной области из РНК клеток, продуцирующих антитела (см., например, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, (1991); Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, (1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley Liss, Inc., 1995).

Описанные здесь высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, для ингибирования активации альтернативного пути. В некоторых вариантах осуществления изобретения высокоаффинным MASP-3-ингибирующим антителом является гуманизированное моноклональное анти-MASP-3 антитела, которое обладает, но необязательно, пониженной эффекторной функцией.

Биспецифические антитела.

Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, используемые в способе согласно изобретению, включают мультиспецифические (т.е. биспецифические и триспецифические) антитела.

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В одном варианте осуществления изобретения, композиции и способы включают применение биспецифического антитела, обладающего специфичностью связывания с доменом сериновой протеазы MASP-3 и специфичностью связывания с MASP-2 (например, связывания по меньшей мере с одним из CCP1-CCP2 или доменом сериновой протеазы MASP-2). В другом варианте осуществления изобретения, способ включает применение биспецифического антитела, обладающего специфичностью связывания с доменом сериновой протеазы MASP-3 и специфичностью связывания с MASP-1 (например, специфичностью связывания с доменом сериновой протеазы MASP-1). В другом варианте осуществления изобретения, способ включает применение триспецифического антитела, обладающего специфичностью связывания с MASP-3 (например, специфичностью связывания с доменом сериновой протеазы MASP-3), специфичностью связывания с MASP-2 (например, специфичностью связывания по меньшей мере с одним CCP1-CCP2 или с доменом сериновой протеазы MASP-2) и специфичностью связывания с MASP-1 (например, специфичностью связывания с доменом сериновой протеазы MASP-1).

Методы получения биспецифических антител находятся в компетенции специалистов в данной области. Традиционно, рекомбинантный метод получения биспецифических антител основан на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи/легкой цепи иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи обладают различными специфичностями (Milstein and Cuello, *Nature* 305:537-539 (1983)). Вариабельные домены антитела с нужными специфичностями связывания (сайты связывания антитело-антиген) могут быть присоединены к последовательностям константных доменов иммуноглобулинов. Такое присоединение предпочтительно осуществляют с использованием константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина, включая по меньшей мере часть шарнирной области, области C_H2 и C_H3. ДНК, кодирующие гибриды тяжелой цепи иммуноглобулина и, если это необходимо, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные векторы и подвергают котрансфекции в подходящий организм-хозяин. Более подробное описание иллюстративных и известных в настоящее время методов получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986); WO96/27011; Brennan et al., *Science* 229:81 (1985); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994); и Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991). Биспецифические антитела также включают перекрестно связанные или гетероконъюгированные антитела. Гетероконъюгированные антитела могут быть получены любыми стандартными методами перекрестного связывания. Подходящие агенты для перекрестного связывания хорошо известны специалистам в данной области и описаны в патенте США No 4676980, вместе с различными методами перекрестного связывания.

Также были описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Так, например, биспецифические антитела были получены с использованием "лейциновых молний" (см., например, Kostelny et al. *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)). Технологии "диантител", описанные Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:6444-6448 (1993), основаны на альтернативном механизме получения фрагментов биспецифических антител. Эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) посредством линкера, который является слишком коротким для спаривания двух доменов на одной и той же цепи. В соответствии с этим, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, образуя, тем самым, два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические диантитела, в отличие от биспецифических полнораз-

мерных антител, также могут быть особенно предпочтительными, поскольку они могут быть легко сконструированы и экспрессированы в *E.coli*. Диантитела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антител), обладающие соответствующими специфичностями связывания, могут быть легко отобраны из библиотек фагового представления (WO 94/13804). Если одна цепь диантитела остается постоянной, например обладает специфичностью, направленной против антигена X, то может быть получена библиотека, в которой другая цепь отличается от первой цепи, а затем может быть отобрано антитело с соответствующей специфичностью.

В литературе также описана и другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (ScFv). (См., например, Gruber et al. *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)). Альтернативно, антитела могут быть "линейными антителами", как описано, например, Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Вкратце, эти антитела содержат пару tandemных сегментов фактора D ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$), которые образуют пару антигенсвязывающих областей. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифичными. Способы согласно изобретению также включают использование различных форм биспецифических антител, таких как четырехвалентные молекулы иммуноглобулина с двумя переменными доменами (DVD-Ig), описанные Wu et al., *Nat. Biotechnol.* 25:1290-1297 (2007). Молекулы DVD-Ig конструируют так, чтобы два различных переменных домена легкой цепи (VL), происходящие от двух различных родительских антител, были tandemно связаны непосредственно или посредством короткого линкера с применением методов рекомбинантной ДНК, с последующим присоединением константного домена легкой цепи. Методы получения молекул DVD-Ig из двух родительских антител дополнительно описаны, например, в заявках WO 08/024188 и WO 07/024715, каждая из которых во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

XVIII. Фармацевтические композиции и способы введения доз.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела для ингибирования побочных эффектов активации комплемента альтернативного пути у индивидуума, нуждающегося в этом, например у индивидуума, страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с альтернативным путем, такими как гемолитическое заболевание, такое как ПНГ, или заболеванием или расстройством, выбранным из группы, состоящей из: возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза (РС), синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амиотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении.

Способы этого аспекта настоящего изобретения включают введение индивидууму композиции, содержащей количество высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования активации комплемента альтернативного пути, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ также включает введение композиции, содержащей MASP-2-ингибирующий агент. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела и MASP-2-ингибирующие агенты могут быть введены индивидууму, нуждающемуся в этом, в терапевтически эффективных дозах для лечения или облегчения состояний, ассоциированных с активацией комплемента альтернативного пути, а также, но необязательно, MASP-2-зависимой активацией комплемента. Терапевтически эффективная доза соответствует количеству MASP-2-ингибирующего антитела или комбинации MASP-3-ингибирующего антитела и MASP-2-ингибирующего агента, достаточному для ослабления симптомов этого состояния. Ингибирование активации комплемента альтернативного пути характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения: ингибирования гемолиза и/или опсонизации; ингибирования лектин-независимого превращения фактора В; ингибирования лектин-независимого превращения фактора D, ингибирования субстрат-специфического расщепления сериновой протеазой MASP-3; снижения степени гемолиза или уменьшения степени расщепления C3 и осаждения C3b на поверхности; уменьшения степени осаждения факторов В и Bb на активирующей поверхности; снижения остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментального добавления активирующей поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; снижения уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активирующую поверхность; и/или продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a.

Токсичность и терапевтическая эффективность MASP-3- и MASP-2-ингибирующих агентов могут

быть определены стандартными фармацевтическими методами с использованием экспериментальных животных-моделей. С помощью таких животных-моделей, NOAEL (отсутствие какого-либо уровня побочных эффектов) и MED (минимально эффективная доза) могут быть определены стандартными методами. Соотношение доз, дающих NOAEL и MED, является терапевтическим индексом, который выражается как отношение NOAEL/MED. MASP-3-ингибирующие агенты и MASP-2-ингибирующие агенты, которые имеют высокие терапевтические отношения или индексы, являются особенно предпочтительными. Данные, полученные в анализах клеточных культур и в исследованиях на животных, могут быть использованы для вычисления доз, вводимых человеку. Доза MASP-3-ингибирующего агента и MASP-2-ингибирующего агента предпочтительно находится в пределах циркулирующих концентраций, которые включают MED с минимальной токсичностью или без токсичности. Доза может варьироваться в пределах этого интервала в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения.

Для любой композиции соединений терапевтически эффективная доза может быть определена с использованием животных-моделей. Так, например, доза может быть определена для животного-модели в целях вычисления интервала концентраций в плазме, который включает MED. Количественные уровни MASP-3-ингибирующего агента или MASP-2-ингибирующего агента в плазме могут быть также определены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Помимо исследований по токсичности эффективная доза может быть определена исходя из количества белка мишени MASP, присутствующего у живого индивидуума и аффинности связывания MASP-3-или MASP-2-ингибирующего агента.

Сообщалось, что уровни MASP-1 в сыворотке здорового человека составляют в пределах от 1,48 до 12,83 мкг/мл (Terai I. et al. Clin. Exp. Immunol. 110:317-323 (1997); Theil et al., Clin. Exp. Immunol. 169:38 (2012)). Сообщалось, что средняя концентрация MASP-3 в сыворотке здорового человека составляет в пределах приблизительно от 2,0 до 12,9 мкг/мл (Skjoedt M. et al., Immunobiology 215(11):921-31 (2010); Degn et al., J. Immunol. Methods, 361-37 (2010); Csuka et al., Mol. Immunol. 54:271 (2013). Было показано, что уровни MASP-2 в сыворотке здорового человека являются низкими и составляют в пределах 500 нг/мл, а уровни MASP-2 у конкретного индивидуума могут быть определены с помощью количественного анализа на MASP-2, как описано Moller Kristensen M. et al., J. Immunol. Methods 282:159 167 (2003) и Csuka et al., Mol. Immunol. 54:271 (2013).

Обычно, доза вводимых композиций, содержащих MASP-3-ингибирующие агенты или MASP-2-ингибирующие агенты, варьируется в зависимости от таких факторов, как возраст, масса, рост, пол, общее состояние здоровья индивидуума и его история болезни. В качестве иллюстрации, MASP-3-ингибирующие агенты или MASP-2-ингибирующие агенты (такие как анти-MASP-3 антитела, анти-MASP-1 антитела или анти-MASP-2 антитела), можно вводить в интервале доз приблизительно от 0,010 до 100,0 мг/кг, предпочтительно, от 0,010 до 10 мг/кг, предпочтительно, от 0,010 до 1,0 мг/кг, а более предпочтительно, от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения MASP-2-ингибирующие агенты (такие как анти-MASP-2 антитела) вводят в интервале доз, предпочтительно, приблизительно от 0,010 до 10 мг/кг, предпочтительно от 0,010 до 1,0 мг/кг, а более предпочтительно, от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения MASP-1-ингибирующие агенты (такие как анти-MASP-1 антитела) или MASP-3-ингибирующие агенты (такие как анти-MASP-3 антитела) вводят в интервале доз приблизительно от 0,010 до 100,0 мг/кг, предпочтительно от 0,010 до 10 мг/кг, например приблизительно от 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, предпочтительно 0,010 до 1,0 мг/кг, а наиболее предпочтительно от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела индивидуума.

Терапевтическая эффективность MASP-3-ингибирующих композиций, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими композициями или с MASP-1-ингибирующими композициями, необязательно в комбинации с MASP-2-ингибирующими композициями, и способы согласно изобретению, применяемые для данного индивидуума, и соответствующие дозы могут быть определены с помощью анализов комплемента, хорошо известных специалистам. Комплемент продуцирует большое число специфических продуктов. В последние десятилетия были разработаны чувствительные, специфические и коммерчески доступные анализы на большинство этих продуктов активации, включая небольшие фрагменты активации C3a, C4a и C5a и крупные фрагменты активации iC3b, C4D, Bb и SC5b-9. В большинстве этих анализов используются моноклональные антитела, которые реагируют с новыми антигенами (неоантигенами), присутствующими на фрагменте, но не на нативных белках, из которых они образуются, что делает эти анализы очень простыми и специфическими. Хотя для определения C3a и C5a иногда используется радиоиммуноанализ, однако, в большинстве случаев применяется ELISA-технология. Эти последние анализы позволяют определить уровни непротессированных фрагментов и их "desArg"-фрагментов, которые представляют собой основные формы, присутствующие в кровотоке. Непротессированные фрагменты и C5a_{desArg} быстро выводятся посредством связывания с рецепторами на поверхности клеток, а поэтому они присутствуют в очень низких концентрациях, тогда как C3a_{desArg} не связывается с клетками и накапливается в плазме. Измерение C3a является чувствительным индикатором, независимым от пути активации комплемента. Активация альтернативного пути может быть оценена путем измерения уровня фрагмента Bb и/или измерения степени активации фактора D. Детектирование жидкофазного продукта активации

пути мембранной атаки, SC5b-9, свидетельствует о том, что комплемент активируется вплоть до завершения реакции. Поскольку лектиновый путь и классический путь генерируют одни и те же продукты активации, C4a и C4d, то оценка уровней этих двух фрагментов не дает никакой информации о том, какой именно из этих двух путей генерирует продукты активации.

Ингибирование активации комплемента альтернативного пути характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела, описанного в настоящей заявке: ингибирования созревания фактора D; ингибирования альтернативного пути при введении антитела индивидууму в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb), но не классического пути; ингибирования гемолиза и/или опсонизации; снижения степени гемолиза или снижения уровня расщепления C3 и осаждения C3b на поверхности; уменьшения степени осаждения факторов B и Bb на активирующей поверхности; снижения остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментального добавления активирующей поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D; снижения уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активирующую поверхность; и/или снижения уровня продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a.

Ингибирование MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним или более из следующих модификаций в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения MASP-3-ингибирующего агента, в соответствии со способами настоящего изобретения: ингибирования генерирования или образования продуктов MASP-2-зависимой системы активации комплемента C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (MAC) (как было измерено и, например, как было описано в примере 2 патента США № 7919094) и снижения уровня расщепления C4 и осаждения C4b или снижения уровня расщепления C3 и осаждения C3b.

Фармацевтические носители и носители для доставки.

Вообще говоря, композиции MASP-3-ингибирующего антитела или композиции, содержащие комбинацию MASP-2- и MASP-3-ингибирующих агентов, могут быть объединены с любыми другими выбранными терапевтическими средствами, и обычно содержатся в фармацевтически приемлемом носителе. Такой носитель является нетоксичным и биологически совместимым, и его выбирают так, чтобы он не оказывал негативного влияния на биологическую активность MASP-3-ингибирующего антитела или MASP-2-ингибирующего антитела (и любых других терапевтических средств, присутствующих в комбинации с этим антителом). Репрезентативные фармацевтически приемлемые носители для полипептидов описаны Yamada в патенте США № 5211657. Анти-MASP-2 антитела, используемые в настоящем изобретении, могут быть приготовлены в виде препаратов в твердой, полутвердой, гелеобразной, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, ингаляторы и инъекции, подходящие для перорального введения, парентерального введения или хирургического вмешательства. В настоящем изобретении также рассматривается местное введение композиций с использованием медицинских устройств с нанесенном на них покрытием и т.п.

Подходящими носителями для парентеральной доставки, осуществляемой путем инъекции, вливания или орошения, и для местной доставки, являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, нормальные или обработанные лактатом растворы Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнкса или пропандиол. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды могут быть использованы стерильные жирные масла. Для этой цели может быть использовано любое биологически совместимое масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для приготовления инъекций могут быть использованы жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Носитель и агент могут быть приготовлены в виде жидкости, суспензии, полимеризуемого или непolyмеризуемого геля, пасты или мази.

Носитель может также содержать вещество для доставки, используемое для замедления (т.е. для продления, отсрочки или регуляции) доставки агента(ов) или для улучшения доставки и всасывания, для повышения стабильности или для улучшения фармакокинетических свойств терапевтического(их) агента(ов). Такими носителями для доставки могут быть, но не ограничиваются ими, например, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных и сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящими системами доставки на основе гидрогелей и мицелл являются сополимеры PEO:PHB:PEO и комплексы "сополимер/циклодекстрин", описанные в WO 2004/009664 A2, а также PEO и комплексы "PEO/циклодекстрин", описанные в публикации заявки на патент США № 2002/0019369 A1. Такие гидрогели могут быть введены местно в область, предназначенную для их действия, или подкожно или внутримышечно для формирования депо пролонгированного высвобождения.

Композиции согласно изобретению могут быть приготовлены для подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутриартериального введения или введения путем ингаляции.

Для внутрисуставной доставки, MASP-3-ингибирующее антитело, необязательно в комбинации с MASP-3-ингибирующим агентом, может быть введено в вышеуказанную жидкость или в инъецируемые гелевые носители, в вышеуказанные инъецируемые носители для пролонгированной доставки или в ги-

луоновую кислоту или в производное гиалуроновой кислоты.

Для перорального введения непертидергических агентов MASP-3-ингибирующее антитело, необязательно в комбинации с MASP-3-ингибирующим агентом, может быть введено в инертном наполнителе или в разбавителе, таком как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза.

Для местного введения MASP-3-ингибирующее антитело, необязательно в комбинации с MASP-3-ингибирующим агентом, может быть введено в виде мази, лосьона, крема, геля, капель, суппозитория, спрея, жидкости или порошка, или в виде систем доставки геля или микрокапсул с помощью трансдермального пластыря.

Были разработаны различные системы для интраназальной доставки и доставки в легкие, включая аэрозоли, ингаляторы с дозируемым клапаном, инсuffляторы и аэрозольные ингаляторы, и эти системы могут быть адаптированы для доставки согласно изобретению в носителе, доставляемом с помощью аэрозоля, ингалятора или аэрозольного ингалятора, соответственно.

Для интратекальной (IT) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставки могут быть использованы соответствующие стерильные системы доставки (например, жидкости, гели, суспензии и т.п.), вводимые способом согласно изобретению.

Композиции согласно изобретению могут также включать биосовместимые эксципиенты, такие как диспергирующие или смачивающие агенты, суспендирующие агенты, разбавители, буферы усилители пенетрации, эмульгаторы, связывающие агенты, загустители, отдушки (для перорального введения).

Фармацевтические носители для антител и пептидов.

Более конкретно, что касается высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител, описанных в настоящей заявке, то репрезентативные препараты могут быть парентерально введены в виде инъектируемых доз раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом разбавителе вместе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масло, физиологический раствор, глицерин или этанол. Кроме того, в композициях, содержащих анти-MASP-3 антитела, могут также присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества, pH-буферизующие вещества и т.п. Дополнительными компонентами фармацевтических композиций являются вазелины (такие как вазелины животного, растительного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. В общих чертах, предпочтительными жидкими носителями для инъектируемых растворов являются гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Анти-MASP-2 антитела могут быть также введены в форме депо-инъекции или имплантата, которые могут быть приготовлены так, чтобы они позволяли осуществлять пролонгированное или периодическое высвобождение активных агентов.

XVIX. Способы введения.

Фармацевтические композиции, содержащие MASP-3-ингибирующие антитела, необязательно, в комбинации с MASP-2-ингибирующими агентами, могут быть введены различными способами в зависимости от того, какой из способов введения, а именно, местный или системный, является наиболее подходящим для лечения данного состояния. Кроме того, композиции согласно изобретению могут быть доставлены путем покрытия имплантируемого медицинского устройства указанными композициями или включения этих композиций в данное устройство.

Системная доставка.

Используемые здесь термины "системная доставка" и "системное введение" означают, но не ограничиваются ими, пероральное и парентеральное введение, включая внутримышечное введение (i.m.), подкожное введение, внутривенное введение (i.v.), внутриартериальное введение, введение путем ингаляции, подязычное введение, трансбуккальное введение, местное введение, чрезкожное введение, интраназальное введение, ректальное введение, вагинальное введение и другие способы введения, которые обеспечивают эффективную доставку нужного антитела в один или множество участков предполагаемого терапевтического действия. Предпочтительными способами системной доставки композиций согласно изобретению являются внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутриартериальное введение и введение путем ингаляции. Следует отметить, что конкретный способ системной доставки выбранных агентов, используемых в конкретных композициях согласно изобретению, определяют частично с учетом восприимчивости данных агентов к метаболическим путям трансформации, ассоциированным с данным способом введения. Так, например, пептидергические агенты могут быть введены любым способом, кроме перорального.

Описанные здесь MASP-3-ингибирующие антитела могут быть введены индивидууму, нуждающемуся в этом, любым подходящим способом. Методы доставки анти-MASP-3 антител и полипептидов включают пероральное введение, пульмональное введение, парентеральное введение (например, внутримышечную, внутривенную, внутривенную (i.v.) или подкожную инъекцию), введение путем ингаляции (препарата в виде тонкодисперсного порошка), чрезкожное введение, интраназальное введение, вагинальное введение, ректальное введение или подязычное введение, и эти антитела и полипептиды могут быть приготовлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого способа введения.

В репрезентативном примере, MASP-3-ингибирующие антитела и пептиды могут быть введены в

живой организм путем их введения в биологическую оболочку, способную абсорбировать данные полипептиды, например в носовую слизистую оболочку, в слизистую желудочно-кишечного тракта и в слизистую прямой кишки. Полипептиды обычно вводят в абсорбирующую оболочку вместе с усилителем проницаемости оболочки. (См., 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)). Так, например, в качестве усилителя проницаемости для интраназальной доставки может быть использован STDHF, т.е. синтетическое производное фузидиновой кислоты, стероидное поверхностно-активное вещество, которое по своей структуре аналогично солям желчных кислот (Lee W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dec. 1990).

Описанные здесь MASP-3-ингибирующие антитела могут быть введены в комбинации с другой молекулой, такой как липид, для защиты полипептидов от ферментативного расщепления. Так, например, ковалентное связывание полимеров, а в частности, полиэтиленгликоля (ПЭГ), было применено для защиты некоторых белков от ферментативного гидролиза в организме и, тем самым, для увеличения времени их полужизни (Fuertges F. et al., *J. Controlled Release* 11:139 (1990)). Многие полимерные системы для доставки белков были описаны в литературе (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 с увеличенным временем полужизни в кровотоке (см., например, патент США № 5741516, Webb). Кроме того, были описаны различные методы получения липосом и липосомо-подобных препаратов в виде потенциальных носителей для лекарственных средств (см., например, патент США № 5567434, Szoka; патент США № 5552157, Yagi; патент США № 5565213, Nakamori; патент США № 5738868, Shinkarenko; и патент США № 5795587, Gao).

Для чрезкожного введения MASP-3-ингибирующие антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть объединены с другими подходящими ингредиентами, такими как носители и/или адъюванты. При этом, могут быть использованы любые другие ингредиенты без каких-либо ограничений, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми для предполагаемого способа введения и не должны оказывать негативное воздействие на активность активных ингредиентов данной композиции. Примерами подходящих носителей являются мази, кремы, гели или суспензии, содержащие или не содержащие очищенный коллаген. MASP-3-ингибирующие антитела могут быть также введены путем пропитки чрезкожных пластырей, гипсовых повязок и бинтов, предпочтительно, жидкими или полутвердыми препаратами.

Системное введение композиций согласно изобретению может быть осуществлено периодически через определенные интервалы времени для поддержания терапевтического эффекта на нужном уровне. Так, например, композиции могут быть введены путем подкожной инъекции через каждые 2-4 недели или через меньшие интервалы времени. Схема введения доз может быть определена лечащим врачом с учетом различных факторов, которые могут влиять на действие данной комбинации агентов. Такими факторами являются степень прогрессирования состояния, подвергаемого лечению, возраст, пол и масса пациента и другие клинические факторы. Дозы каждого отдельного агента могут варьироваться в зависимости от функции MASP-3-ингибирующего антитела или MASP-2-ингибирующего агента, включенного в данную композицию, а также от присутствия и природы любого носителя для доставки лекарственного средства (например, носителя для доставки с пролонгированным высвобождением). Кроме того, количество дозы может быть скорректировано с учетом изменения частоты введения и фармакокинетических свойств доставляемого(ых) агента(ов).

Местное введение.

Используемый здесь термин "местное" введение охватывает введение лекарственного средства в область предполагаемого локализованного участка действия и в область, находящуюся поблизости от этого участка, и может включать, например, местное нанесение на кожу или на другие пораженные ткани, офтальмическое введение, интратекальное введение (IT), интрацеребровентрикулярное введение (ICV), внутрисуставное введение, внутрисуставное введение, внутричрепное введение или интравезикулярное введение, введение стента или лаваж. Местное введение может оказаться предпочтительным для введения более низкой дозы, для предотвращения системных побочных эффектов и для более точной регуляции времени доставки и концентрации активных агентов в области местного введения. Местное введение предусматривает введение известной концентрации в нужный участок, независимо от различий путей метаболизма, системы кровообращения и т.п. Прямой способ доставки также позволяет лучше регулировать введение доз.

Местная доставка MASP-3-ингибирующего антитела или MASP-2-ингибирующего агента может быть достигнута хирургическими методами лечения заболевания или состояния, например, во время операций по артериальному шунтированию, атероктомии, лазерной хирургии, ультразвуковой хирургии, баллонной ангиопластики и операции по установлению стента. Так, например, MASP-3-ингибирующее

антитело или MASP-2-ингибирующий агент могут быть введены индивидууму в комбинации с баллонной ангиопластикой. Баллонная ангиопластика включает введение катетера, содержащего баллон с выкачанным воздухом, в артерию. Баллон с выкачанным воздухом помещают поблизости от атеросклеротической бляшки и накачивают так, чтобы бляшка впрессовывалась в стенку сосуда. В результате этого, поверхность баллона контактирует со слоем сосудистых эндотелиальных клеток на поверхности кровеносных сосудов. MASP-3-ингибирующее антитело или MASP-2-ингибирующий агент могут быть присоединены к катетеру для баллонной ангиопластики так, чтобы это приводило к высвобождению данного агента в область локализации атеросклеротической бляшки. Этот агент может быть присоединен к баллонному катетеру стандартными методами, известными специалистам. Так, например, такой агент может храниться в отделении баллонного катетера вплоть до накачки данного баллона воздухом, и после этого начинает высвобождаться в окружающую среду. Альтернативно, поверхность баллона может быть пропитана данным агентом так, чтобы она контактировала с клетками стенки артерий по мере накачивания баллона воздухом. Такой агент может также доставляться в перфорированный баллонный катетер, как описано Flugelman M.Y. et al., *Circulation* 85: 1110-1117 (1992). См. также опубликованную заявку PCT WO 95/23161, где описана репрезентативная процедура связывания терапевтического белка с катетером для баллонной ангиопластики. Аналогичным образом, MASP-3-ингибирующий агент или MASP-2-ингибирующий агент может быть включен в гель или в полимерное покрытие, наносимые на стент, либо он может быть включен в материал, из которого изготовлен данный стент, так, чтобы этот стент мог высвобождать MASP-3-ингибирующий агент или MASP-2-ингибирующий агент после его помещения в кровеносные сосуды.

MASP-3-ингибирующие антитела, используемые для лечения артрита и других скелетно-мышечных расстройств, могут быть введены местно путем внутрисуставной инъекции. Такие композиции могут включать соответствующий носитель для доставки пролонгированного высвобождения. Как и в другом примере, где может быть желательной местная доставка, MASP-3-ингибирующие композиции, используемые для лечения урогенитальных заболеваний, могут быть соответствующим образом введены интравезикулярно или в другую урогенитальную структуру.

XX. Схемы лечения.

Фармацевтические композиции, используемые в профилактических целях, вводят индивидууму, чувствительному к развитию заболевания или расстройства, ассоциированного с альтернативным путем, или индивидууму с риском развития такого заболевания или расстройства, например заболевания или расстройства, ассоциированного с альтернативным путем и выбранного из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичский гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амиотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска развития симптомов заболевания. Фармацевтические композиции, используемые в терапевтических целях, вводят индивидууму с подозрением на заболевание или расстройство, ассоциированное с альтернативным путем, или индивидууму, уже страдающему таким заболеванием или расстройством, например, заболеванием или расстройством, ассоциированным с альтернативным путем и выбранным из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичский гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амиотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для ослабления или по меньшей мере частичного ослабления симптомов заболевания.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию, содержащую высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, вводят индивидууму, страдающему ПНГ, или индивидууму с риском развития ПНГ. В соответствии с этим, эритроциты индивидуума подвергают опсонизации фрагментами С3 в отсутствие композиции, где введение композиции индивидууму способствует повышению жизнеспособности эритроцитов у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения у индивидуума, в отсутствие композиции, наблюдаются один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из: (i) снижения гемоглобина до уровней ниже нормы, (ii) снижения числа тромбоцитов до уровней ниже нормы; (iii) увеличения числа ретикулоцитов до уровней выше нормы; и (iv) повышения билирубина до уровней выше нормы, и введение композиции индивидууму позволяет устранить по меньшей мере один или более симптомов, и тем самым, (i) повысить гемоглобин до нормы или до уровня, близкого к норме; (ii) повысить число тромбоцитов до нормы или до уровня, близкого к норме; (iii) снизить число ретикулоцитов до нормы или до уровня, близкого к норме; и (iv) снизить уровни билирубина до нормы или до уровня, близкого к норме.

В соответствии со схемами профилактики и терапии, применяемыми для лечения, профилактики или ослабления тяжести заболевания или состояния, выбранных из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва и болезни Бехчета, композиции, содержащие высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела и необязательно MASP-2-ингибирующие агенты, могут быть введены в нескольких дозах до тех пор, пока у индивидуума не будет наблюдаться желаемый терапевтический результат. В одном из вариантов осуществления изобретения высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело и/или MASP-2-ингибирующий агент могут быть введены взрослому пациенту (например, со средней массой 70 кг) в дозе от 0,1 до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 до 1000 мг, а наиболее предпочтительно от 50,0 до 500 мг или от 10 до 200 мг. Для введения детям, доза может быть скорректирована в зависимости от массы тела пациента.

Применение высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител и необязательно MASP-2-ингибирующих композиций согласно изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции (например, одной композиции, содержащей MASP-3- и необязательно MASP-2-ингибирующие агенты или биспецифические агенты или агенты двойного ингибирующего действия, или совместного введения отдельных композиций), или ограниченного ряда введений для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с альтернативным путем, такого как заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амиотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), С3-гломерулонефрита, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении.

Альтернативно, композиция может быть введена периодически с интервалами, например, ежедневно, 2 раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или два раза в месяц в течение продолжительного периода времени в соответствии с назначением врача до достижения оптимального терапевтического эффекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первую композицию, содержащую по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, и вторую композицию, содержащую, по меньшей мере один MASP-2 ингибирующий агент, вводят индивидууму, страдающему заболеванием или состоянием, или индивидууму с риском развития заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из: пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, ней-

ромиелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амилотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении.

В одном варианте осуществления изобретения, первую композицию, содержащую по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, и вторую композицию, содержащую, по меньшей мере один MASP-2 ингибирующий агент, вводят одновременно (т.е. с перерывами приблизительно не более чем приблизительно 15 мин или менее, например не более чем 10, 5 или 1 мин). В одном варианте осуществления изобретения первую композицию, содержащую по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, и вторую композицию, содержащую по меньшей мере один MASP-2-ингибирующий агент, вводят последовательно (т.е. первую композицию вводят до или после введения второй композиции, где интервалы между введением составляют более 15 мин). В некоторых вариантах осуществления изобретения первую композицию, содержащую по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, и вторую композицию, содержащую по меньшей мере один MASP-2-ингибирующий агент, вводят одновременно (т.е. время введения первой композиции перекрывается со временем введения второй композиции). Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, первую композицию и/или вторую композицию вводят в течение периода времени, составляющего по меньшей мере одну, две, три или четыре недели или более. В одном варианте осуществления изобретения, по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело и по меньшей мере один MASP-2-ингибирующий агент объединяют в унифицированную лекарственную форму. В одном варианте осуществления изобретения, первую композицию, содержащую по меньшей мере одно высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело, и вторую композицию, содержащую по меньшей мере один MASP-2-ингибирующий агент, упаковывают вместе в наборе для его применения в целях лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с альтернативным путем, такого как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП), ишемическо-реперфузионное повреждение, артрит, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, тромботическая микроангиопатия (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичский гемолитический уремический синдром (аГУС), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астма, болезнь плотных отложений, олигоиммунный некрозирующий серповидный гломерулонефрит, черепно-мозговая травма, аспирационная пневмония, эндофтальмит, нейромиеелит зрительного нерва, болезнь Бехчета, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, болезнь Альцгеймера, амилотрофический боковой склероз (АБС), волчаночный нефрит, системная красная волчанка (СКВ), диабетическая ретинопатия, увеит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатия, отторжение трансплантата, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализ, сепсис, синдром системного воспалительного ответа (СВО), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), ANCA-васкулит, антифосфолипидный синдром, атеросклероз, IgA-нефропатия или тяжелая миастения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум, страдающий ПНГ, возрастной дегенерацией желтого пятна (ВДЖП), ишемическим-реперфузионным повреждением, артритом, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, тромботической микроангиопатией (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичский гемолитический уремический синдром (аГУС), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)), астмой, болезнью плотных отложений, олигоиммунным некрозирующим серповидным гломерулонефритом, травматическим повреждением головного мозга, аспирационной пневмонией, эндофтальмитом, нейромиеелитом зрительного нерва, болезнью Бехчета, рассеянным склерозом, синдромом Гийена-Барре, болезнью Альцгеймера, амилотрофическим боковым склерозом (АБС), волчаночным нефритом, системной красной волчанкой (СКВ), диабетической ретинопатией, увеитом, хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), СЗ-гломерулопатией, отторжением трансплантата, болезнью "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализом, сепсисом, синдромом системного воспалительного ответа (СВО), острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), ANCA-васкулитом, антифосфолипидным синдромом, атеросклерозом, IgA-нефропатией или тяжелой миастенией, уже проходил лечение или в настоящее время проходит лечение с использованием ингибитора терминального комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение индивидууму композиции согласно изобретению, содержащей высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело и необязательно ингибитор MASP-2, а также введение индивидууму ингибитора терминального комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитором терминального комплемента является гуманизированное анти-C5 антитело или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибитором терминального комплемента является экулизумаб.

XXI. Примеры.

Нижеследующие примеры приводятся лишь для иллюстрации наилучшего способа осуществления изобретения, который не должен рассматриваться как ограничение объема изобретения. Все цитируемые здесь документы точно вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Пример 1.

В этом примере продемонстрировано, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от *Neisseria meningitidis*-индуцированной гибели после инфицирования *N.meningitidis* серологической группы А или *N.meningitidis* серологической группы В.

Методы.

Мыши с MASP-2-нокаутом (MASP-2-НК-мыши) были получены как описано в примере 1 патента США 7919094, который вводится в настоящее описание посредством ссылки. 10-недельных MASP-2-НК-мышей (n=10) и мышей дикого типа (WT) C57/BL6 (n=10) инокулировали путем внутрибрюшинной (IP) инъекции в дозе $2,6 \times 10^7$ к.о.е. *N.meningitidis* серологической группы А Z2491 в объеме 100 мкл. Мышам вводили инфекционную дозу в комбинации с железосодержащим декстраном в конечной концентрации 400 мг/кг. Мониторинг выживаемости мышей после инфицирования проводили в течение 72 ч.

В отдельном эксперименте 10-недельных MASP-2-НК-мышей (n=10) и мышей дикого типа (WT) C57/BL6 (n=10) инокулировали путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58 в объеме 100 мкл. Мышам вводили инфекционную дозу в комбинации с железосодержащим декстраном в конечной концентрации 400 мг/кг. Мониторинг выживаемости мышей после инфицирования проводили в течение 72 ч. Оценку заболевания также осуществляли для мышей дикого типа и для MASP-2-НК-мышей в течение 72-часового периода времени после заражения, исходя из оценки параметров заболевания, представленных ниже в табл. 5, которую проводили по схеме Franssen и др. (2010) с небольшими изменениями.

Таблица 5. Оценка заболевания, ассоциированного с клиническими признаками у инфицированных мышей

Признаки	Оценка
Нормальный	0
Слегка бугристый налет	1
Бугристый налет, медленное движение и слипаемость глаз	2
Бугристый налет, вялое движение глаз и закрытие века	3
Очень болезненное состояние и отсутствие движения после стимуляции	4
Гибель	5

Пробы крови брали у мышей с часовыми интервалами после инфицирования и анализировали в целях определения уровня *N.meningitidis* в сыворотке (log к.о.е./мл) для подтверждения инфицирования и определения скорости клиренса бактерий из сыворотки.

Результаты.

На фиг. 6 представлен график Каплана-Мейера, иллюстрирующий процент выживаемости MASP-2-НК-мышей и мышей дикого типа после введения инфекционной дозы $2,6 \times 10^7$ к.о.е. *N.meningitidis* серологической группы А Z2491. Как показано на фиг. 6, 100% MASP-2-НК-мышей выживали в течение 72 ч после инфицирования. В противоположность этому, только 80% мышей дикого типа (p=0,012) были еще живы в течение 24 ч после инфицирования, и только 50% мышей дикого типа были еще живы через 72 ч после инфицирования. Эти результаты показали, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от гибели, вызываемой *N.meningitidis* серологической группы А Z2491.

На фиг. 7 представлен график Каплана-Мейера, иллюстрирующий процент выживаемости MASP-2-НК-мышей и мышей дикого типа после введения инфекционной дозы 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58. Как показано на фиг. 7, 90% MASP-2-НК-мышей выживали в течение 72 ч после инфицирования. В противоположность этому, только 20% мышей дикого типа (p=0,0022) были еще живы в течение 24 ч после инфицирования. Эти результаты показали, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от гибели, вызываемой штаммом *N.meningitidis* серологической группы В MC58.

На фиг. 8 графически проиллюстрированы log к.о.е./мл штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58, выделенного в различные периоды времени из проб крови, взятых у MASP-2-НК-мышей и мышей дикого типа после i.p.-инфицирования 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58 (n=3 в различные периоды времени для мышей обеих групп). Результаты выражены как средние значения $\pm$ ср. кв. откл. Как показано на фиг. 8, у мышей дикого типа, уровень *N.meningitidis* в крови достигал пика приблизительно 6,0 log к.о.е./мл через 24 ч после инфицирования и снижался при-

близительно до $4,0 \log$ к.о.е./мл через 36 ч после инфицирования. В противоположность этому у MASP-2-НК-мышей, уровень *N.meningitidis* в крови достигал пика приблизительно $4,0 \log$ к.о.е./мл через 12 ч после инфицирования и снижался приблизительно до $1,0 \log$ к.о.е./мл через 36 ч после инфицирования (символ "*" означает $p < 0,05$; символ "***" означает $p = 0,0043$). Эти результаты показали, что, хотя MASP-2-НК-мыши были инфицированы такой же дозой штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58, как и мыши дикого типа, однако, у MASP-2-НК-мышей наблюдался повышенный клиренс бактериемии по сравнению с мышами дикого типа.

На фиг. 9 графически проиллюстрирована средняя оценка заболеваемости MASP-2-НК-мышей и мышей дикого типа через 3, 6, 12 и 24 ч после инфицирования 6×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58. Как показано на фиг. 9, у MASP-2-дефицитных мышей наблюдалась высокая резистентность к инфекции с гораздо более низкими баллами заболевания через 6 часов (символ "*" означает $p = 0,0411$), 12 ч (символ "***" означает $p = 0,0049$) и 24 ч (символ "****" означает $p = 0,0049$) после инфицирования, по сравнению с мышами дикого типа. Результаты, представленные на фиг. 9, выражены как средние значения $\pm$ ср. кв. откл.

В целом, результаты этого примера показали, что MASP-2-дефицитные мыши были защищены от *Neisseria meningitidis*-индуцированной гибели после инфицирования *N.meningitidis* серологической группы А или *N.meningitidis* серологической группы В.

Пример 2.

В этом примере показано, что введение анти-MASP-2 антитела после инфицирования *N.meningitidis* повышало выживаемость мышей, инфицированных *N.meningitidis*.

Общее описание/Обоснование.

Как описано в примере 24 патента США 7919094, который вводится в настоящее описание посредством ссылки, крысиный белок MASP-2 был использован для скрининга библиотеки фагового представления Fab, где Fab2 #11 был идентифицирован как функционально активное антитело. Полноразмерное крысиное антитело изотипа IgG2c и мышинное антитело изотипа IgG2a были получены из Fab2 #11. Полноразмерное мышинное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a было охарактеризовано на фармакодинамические параметры (как описано в примере 38 патента США № 7919094).

В этом примере полноразмерное мышинное анти-MASP-2 антитело, происходящее от Fab2 # 11, анализировали на мышинной модели *N.meningitidis*-инфекции.

Методы.

Полноразмерное мышинное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a, происходящее от Fab2 #11, получали, как описано выше, и тестировали на мышинной модели *N.meningitidis*-инфекции следующим образом.

1. Введение мышинных моноклональных анти-MASP-2 антител (MoAb) после инфицирования 9-недельных мышей C57/BL6 Charles River обрабатывали мышинным MASP-3-ингибирующим антителом ($1,0 \text{ мг/кг}$) ($n=12$) или антителом контрольного изотипа ($n=10$) через 3 ч после i.p. инъекции высокой дозы (4×10^6 к.о.е.) штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58.

Результаты.

На фиг. 10 представлен график Каплана-Мейера, на котором проиллюстрирован процент выживаемости мышей после введения им инфекционной дозы 4×10^6 к.о.е. штамма *N.meningitidis* серологической группы В MC58, с последующим введением через 3 ч после инфицирования либо MASP-2-ингибирующего антитела ($1,0 \text{ мг/кг}$), либо антитела контрольного изотипа. Как показано на фиг. 10, 90% мышей, обработанных анти-MASP-2 антителом, выживали в течение 72 ч после инфицирования. В противоположность этому, только 50% мышей, обработанных антителом контрольного изотипа, выживали в течение 72 ч после инфицирования. Символ "*" означает $p = 0,0301$, как это было определено путем сравнения двух кривых выживаемости.

Эти результаты показали, что введение анти-MASP-2 антитела является эффективным для лечения и увеличения продолжительности жизни у индивидуумов, инфицированных *N.meningitidis*.

Как продемонстрировано в настоящем описании, использование анти-MASP-2 антитела для лечения индивидуума, инфицированного *N.meningitidis*, является эффективным при его введении в течение 3 ч после инфицирования и предполагается, что оно будет эффективным через 24-48 ч после инфицирования.

Менингококковое заболевание (либо менингококкемия, либо менингит) требует неотложной медицинской помощи, и его лечение обычно начинают сразу после подозрения на менингококковое заболевание (т.е. до того, как *N.meningitidis* будет позитивно идентифицирован как этиологический фактор).

С учетом результатов, полученных для MASP-2-НК-мышей и представленных в примере 1, было высказано предположение, что введение анти-MASP-2 антитела до инфицирования *N.meningitidis*, может также быть эффективным для профилактики инфекции или ослабления ее тяжести.

Пример 3.

В этом примере проиллюстрировано, что комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в человеческой сыворотке зависит от MASP-3.

Обоснование.

Пациенты с пониженным уровнем функционального MBL в сыворотке обладали повышенной восприимчивостью к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям (Kilpatrick et al., Biochim Biophys Acta 1572:401-413 (2002)). Известно, что N.meningitidis распознается MBL, и было показано, что MBL-дефицитная сыворотка не лизирует N.meningitidis.

С учетом результатов, описанных в примерах 1 и 2, была проведена серия экспериментов для определения эффективности введения анти-MASP-2 антитела для устранения инфекции N.meningitidis в комплемент-дефицитной сыворотке и в контрольной человеческой сыворотке. Эксперименты были проведены в сыворотке с высокой концентрацией (20%) для оценки сохранения пути комплемента.

Методы.

2. Бактерицидная активность в различных комплемент-дефицитных человеческих сыворотках и в человеческой сыворотке, обработанных человеческим анти-MASP-2 антителом.

В этом эксперименте были использованы следующие комплемент-дефицитные человеческие сыворотки и контрольные человеческие сыворотки.

Таблица 6: Тестируемые пробы человеческой сыворотки (как показано на фиг. 11)

Проба	Тип сыворотки
A	Нормальная человеческая сыворотка (NHS)+человеческое анти-MASP-2 Ab
B	NHS+Ab контрольного изотипа
C	Человеческая MBL ^{-/-} -сыворотка
D	NHS
E	Термоинактивированная (HI) NHS

Рекомбинантное антитело против человеческого MASP-2 выделяли 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. 275:25894-25902 (2001)). scFv-фрагмент античеловеческого антитела, который потенциально ингибировал опосредованную лектиновым путем активацию C4 и C3 в человеческой плазме (IC₅₀ ~ 20 nM), идентифицировали и превращали в полноразмерное человеческое антитело IgG4.

Штамм N.meningitidis серологической группы B-MC58 инкубировали с различными сыворотками, представленными в табл. 6, в концентрациях 20%, без добавления или с добавлением человеческого MASP-2-ингибирующего антитела (3 мкг в общем объеме 100 мкл) при 37°C со встряхиванием. Затем брали пробы через определенные периоды времени, а именно, через 0, 30, 60 и 90 мин, высевали и определяли число жизнеспособных клеток. Термоинактивированную человеческую сыворотку использовали в качестве негативного контроля.

Результаты.

На фиг. 11 графически проиллюстрирован log к.о.е./мл количества жизнеспособного штамма N.meningitidis серологической группы B MC58, выделенного в различные периоды времени из проб человеческой сыворотки, указанных в табл. 6. В табл. 7 представлены результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 11.

Таблица 7. Результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 11 (на момент времени 60 мин)

	Среднее различие (Log)	Значимое? P<0,05?	Суммарная величина P
A по сравнению с B	-0,3678	Да	*** (0,0002)
A по сравнению с C	-1,1053	Да	*** (p<0,0001)
A по сравнению с D	-0,2111	Да	** (0,0012)
C по сравнению с D	1,9	Да	*** (p<0,0001)

Как показано на фиг. 11 и в табл. 7, комплемент-зависимый лизис N.meningitidis в 20% человеческой сыворотке был значительно увеличен после добавления человеческого MASP-2-ингибирующего антитела.

2. Бактерицидная активность в различных комплемент-дефицитных человеческих сыворотках.

В этом эксперименте были использованы следующие комплемент-дефицитные человеческие сыворотки и контрольные человеческие сыворотки.

Таблица 8. Тестируемые пробы человеческой сыворотки (как показано на фиг. 12)

Проба	Тип сыворотки
A	Нормальная человеческая сыворотка (NHS)
B	Термоинактивированная NHS
C	MBL ^{-/-}
D	MASP-3 ^{-/-} (MASP-1 ⁺)

Примечание: MASP-3^{-/-} (MASP-1⁺)-сыворотку в пробе D брали у индивидуума с ЗМС-синдромом, который является общим термином, охватывающим синдромы Карневала, Мингарелли, Мальпеха и Ми-хаэлиса. Как дополнительно описано в примере 4, мутации в экзоне 12 гена MASP-1/3 сообщают дисфункциональность домену сериновой протеазы MASP-3, но не MASP-1. Как описано в примере 10, про-фактор D преимущественно присутствует в ЗМС-сыворотке, тогда как активированный фактор D преимущественно присутствует в нормальной человеческой сыворотке.

Штамм *N.meningitidis* серологической группы B-MC58 инкубировали с различными комплемент-дефицитными человеческими сыворотками, каждая из которых имела концентрацию 20%, при 37°C со встряхиванием. Затем брали пробы через определенные периоды времени, а именно, через 0, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин, высевали и определяли число жизнеспособных клеток.

Термоинактивированную человеческую сыворотку использовали в качестве негативного контроля.

Результаты.

На фиг. 12 графически проиллюстрирован log к.о.е./мл количества жизнеспособного штамма *N.meningitidis* серологической группы B-MC58, выделенного в различные периоды времени из проб человеческой сыворотки, указанных в табл. 8. Как показано на фиг. 12, сыворотка дикого типа (NHS) имеет самый высокий уровень бактерицидной активности для *N.meningitidis*. В противоположность этому, MBL^{-/-}- и MASP-3^{-/-}-человеческая сыворотка (которая содержит достаточное количество MASP-1) не обладает какой-либо бактерицидной активностью. Эти результаты указывают на то, что комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в 20% человеческой сыворотке (об/об) является MASP-3- и MBL-зависимым. В табл. 9 представлены результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 12.

Таблица 9. Результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 12

Сравнение	Момент времени (мин)	Среднее различие (Log)	Значимое? P<0,05?	Суммарная величина P
A по сравнению с B	60	-0,8325	Да	*** (p<0,0001)
A по сравнению с B	90	-1,600	Да	*** (p<0,0001)
A по сравнению с C	60	-1,1489	Да	*** (p<0,0001)
A по сравнению с C	90	-1,822	Да	*** (p<0,0001)
A по сравнению с D	60	-1,323	Да	*** (0,0005)
A по сравнению с D	90	-2,185	Да	*** (p<0,0001)

В целом, результаты, представленные на фиг. 12 и в табл. 9, показали, что комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в 20% человеческой сыворотке является MASP-3- и MBL-зависимым.

3. Комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в 20% (об./об.) мышиной сыворотке, дефицитной по MASP-2, MASP-1/3 или MBL A/C.

В этом эксперименте были использованы следующие комплемент-дефицитные мышиные сыворотки и контрольные мышиные сыворотки.

Таблица 10. Тестируемые пробы мышиной сыворотки (как показано на фиг. 13)

Проба	Тип сыворотки
A	Дикого типа
B	MASP-2 ^{-/-}
C	MASP-1/3 ^{-/-}
D	MBL A/C ^{-/-}
E	Термоинактивированная сыворотка дикого типа (HIS)

Штамм *N.meningitidis* серологической группы В-МС58 инкубировали с различными комплемент-дефицитными мышиными сыворотками, каждая из которых имеет концентрацию 20%, при 37°C со встряхиванием. Затем брали пробы через определенные периоды времени, а именно, через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин, высевали и определяли число жизнеспособных клеток. Термоинактивированную человеческую сыворотку использовали в качестве негативного контроля.

Результаты.

На фиг. 13 графически проиллюстрирован $\log$ к.о.е./мл жизнеспособных клеток *N.meningitidis* серологической группы В-МС58, выделенных в различные периоды времени из проб мышинной сыворотки как показано в табл. 10. Как показано на фиг. 13, мышинная MASP-2^{-/-}-сыворотка имеет более высокий уровень бактерицидной активности для *N.meningitidis*, чем мышинная сыворотка дикого типа. В противоположность этому, мышинная MASP-1/3^{-/-}-сыворотка не обладала какой-либо бактерицидной активностью. Символ "***" означает $p=0,0058$, а символ "****" означает $p=0,001$. В табл. 11 представлены результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 13.

Таблица 11. Результаты t-критерия Стьюдента для фиг. 13

Сравнение	Момент времени	Среднее различие (LOG)	Значимое? ($p < 0,05$) ?	Суммарная величина P
А по сравнению с В	60 мин.	0,39	Да	** (0,0058)
А по сравнению с В	90 мин.	0,6741	Да	*** (0,001)

В целом, результаты этого примера показали, что MASP-2^{-/-}-сыворотка имеет более высокий уровень бактерицидной активности для *N.meningitidis*, чем сыворотка дикого типа, и что комплемент-зависимый лизис *N.meningitidis* в 20% человеческой сыворотке является MASP-3- и MBL-зависимым.

Пример 4.

В этом примере описана серия экспериментов, которые были проведены для определения механизма MASP-3-зависимой резистентности к инфицированию *N.meningitidis*, наблюдаемой у MASP-2-НК-мышей, как описано в примерах 1-3.

Обоснование.

Для определения механизма MASP-3-зависимой резистентности к инфицированию *N.meningitidis*, наблюдаемой у MASP-2-НК-мышей (как описано выше в примерах 1-3), была проведена серия нижеприведенных экспериментов.

1. MASP-1/3-дефицитные мыши не являются дефицитными по функциональной активности лектинового пути (также называемого "LEA-2").

Методы.

Для того чтобы определить, являются ли MASP-1/3-дефицитные мыши дефицитными по функциональной активности лектинового пути (также называемого "LEA-2"), был проведен анализ для оценки кинетики C3-конвертазной активности в плазме у различных комплемент-дефицитных мышей, протестированных в условиях анализа, специфичного к активации лектинового пути (в 1% плазме), как описано в публикации Schwaebler W. et al., PNAS vol 108(18):7523-7528 (2011), которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Плазму тестировали у мышей дикого типа и у мышей, дефицитных по C4, MASP-1/3; фактору В и MASP-2.

Для оценки активации C3, микротитрационные планшеты покрывали маннаном (1 мкг/лунку), зимозаном (1 мкг/лунку) в буфере для нанесения покрытий (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃), или иммунными комплексами, продуцируемыми *in situ* путем покрытия 1% альбумином человеческой сыворотки (HSA) в буфере для нанесения покрытий, а затем добавляли овечью анти-HAS сыворотку (2 мкг/мл) в TBS (10 mM Трис, 140 mM NaCl, pH 7,4) вместе с 0,05% Твина 20 и 5 mM Ca⁺⁺. Планшеты блокировали 0,1% HSA в TBS и три раза промывали TBS/Твином 20/Ca⁺⁺. Пробы плазмы разводили в 4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4, добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. После промывки, связанный C3b детектировали с использованием кроличьего антитела против человеческого C3c (Dako), а затем с использованием козьего антитела против кроличьих IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и п-нитрофенилфосфата.

Результаты.

Кинетика активации C3 (оцененная по осаждению C3b на покрытых маннаном планшетах с 1% сывороткой) в условиях, специфичных к лектиновому пути, проиллюстрирована на фиг. 14. В MASP-2^{-/-}-плазме, расщепления C3 не наблюдалось. Плазма с дефицитом фактора В (фактора В^{-/-}) расщепляла C3 наполовину медленнее, чем плазма дикого типа, что, вероятно, обусловлено отсутствием петли амплификации. Значительное замедление превращения C3 в C3b, зависящего от лектинового пути, наблюдалось в C4^{-/-}-плазме ($T_{1/2}=33$ мин), в также в MASP-1/3-дефицитной плазме ($T_{1/2}=49$ минут). Такое замедление активации C3 в MASP-1/3^{-/-}-плазме наблюдалось в зависимости от MASP-1, но не MASP-3 (см.

Takahashi M. et al., J Immunol. 180:6132-6138 (2008)). Эти результаты продемонстрировали, что MASP-1/3-дефицитные мыши не являются дефицитными по функциональной активности лектинового пути (также называемого "LEA-2").

2. Влияние наследственного дефицита MASP-3 на активацию альтернативного пути.

Обоснование.

Влияние наследственного дефицита MASP-3 на активацию альтернативного пути определяли путем тестирования сыворотки MASP-3-дефицитного пациента с ЗМС-синдромом, вызываемым мутацией со сдвигом рамки считывания в экзоне, кодирующей сериновую протеазу MASP-3. ЗМС-синдром назван общим термином, охватывающим синдромы Карневалы, Мингарелли, Мальпеха и Михаэлиса. Эти редкие аутосомные рецессивные расстройства имеют определенный спектр пороков развития, включая характерный лицевой дисморфизм, заячью губу и/или расщелины неба, краниосиностоз, умственную отсталость и патологии гениталий, конечностей и мочевого пузыря. Rooryck и др. (Rooryck et al. Nature Genetics 43:197-203 (2011)) исследовали 11 семей с ЗМС-синдромом и идентифицировали два мутированных гена, COLEC11 и MASP-1. Мутации в гене MASP-1 сообщали дисфункциональность экзону, кодирующему домен сериновой протеазы MASP-3, но не экзонам, кодирующим домен сериновой протеазы MASP-1. Следовательно, у ЗМС-пациентов с мутациями в экзоне, кодирующей сериновую протеазу MASP-3, наблюдался дефицит MASP-3, но достаточное количество MASP-1.

Методы.

MASP-3-дефицитная сыворотка была взята у ЗМС-пациента, у матери и отца ЗМС-пациента (гетерозиготных по аллелю, несущему мутацию, сообщающую дисфункциональность экзону, кодирующему домен сериновой протеазы MASP-3), а также у C4-дефицитного пациента (дефицитного по человеческим генам C4) и у MBL-дефицитного индивидуума. Анализ альтернативного пути осуществляли в традиционных АП-специфических условиях (BBS/Mg⁺⁺/EGTA, без Ca⁺⁺, где BBS=забуференный барбиталом физиологический раствор, содержащий сахарозу), как описано Bitter-Suermann et al., Eur. J. Immunol. 11:291-295 (1981)), на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах при концентрации сыворотки от 0,5 до 25% и оценивали уровень осаждения C3b в течение определенного периода времени.

Результаты.

На фиг. 15 графически проиллюстрирован уровень осаждения C3b, индуцированный альтернативным путем, на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации в пробах сыворотки, взятых у индивидуумов с дефицитом MASP-3, C4 и MBL. Как показано на фиг. 15, в сыворотке MASP-3-дефицитных пациентов наблюдалась остаточная активность альтернативного пути (АП) при высоких сывороточных концентрациях (сывороточных концентрациях 25, 12,5, 6,25%), и значительно более высокий AP₅₀ (т.е. 9,8% сыворотка, необходимая для достижения 50% от максимального осаждения C3).

На фиг. 16 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в "традиционных" условиях, специфичных к альтернативному пути (АП-специфичных) (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) в зависимости от времени, в пробах 10% человеческой сыворотки, взятых у человека с дефицитом MASP-3, C4 и MBL.

В приведенной ниже табл. 12 систематизированы результаты AP₅₀, представленные на фиг. 15, и время полуосаждения C3b, как показано на фиг. 16.

Таблица 12. Систематизированные результаты, представленные на фиг. 15 и 16

Тип сыворотки	AP ₅₀ (%)	T _{1/2} (мин)
MASP-3-дефицитная (ЗМС-пациент)	9,8	37,4
Мать ЗМС-пациента (гетерозиготная)	4,3	17,2
Отец ЗМС-пациента (гетерозиготный)	4,3	20,9
C4-дефицитная	4,0	11,6
MBL-дефицитная	4,8	11,0

Примечание: В BBS/Mg⁺⁺/EGTA-буфере, эффекты, опосредуемые лектиновым путем, не наблюдались из-за отсутствия в этом буфере.

В целом, в условиях этих анализов, альтернативный путь у ЗМС-пациента был значительно нарушен.

3. Оценка уровня осаждения C3b на маннанае, зимозане и S. pneumonia D39 в мышинной сыворотке, дефицитной по MASP-2 или MASP-1/3.

Методы.

Осаждение C3b оценивали на микротитрационных планшетах, покрытых маннаном, зимозаном и S.pneumonia D39, с использованием мышинной сыворотки в концентрации в пределах от 0 до 20%, взятой у MASP-2^{-/-}, MASP-1/3^{-/-}-мышей и мышей дикого типа. Анализы на осаждение C3b проводили либо в "традиционных" условиях, специфичных к альтернативному пути (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), либо в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺).

Результаты.

На фиг. 17А графически проиллюстрирован уровень осаждения С3b на покрытых маннаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей в традиционных условиях, специфичных к альтернативному пути (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), либо в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺). На фиг. 17В графически проиллюстрирован уровень осаждения С3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей, либо в традиционных АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), либо в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺). На фиг. 17С графически проиллюстрирован уровень осаждения С3b на покрытых *S.pneumoniae* D39 микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у мышей дикого типа, MASP-2-дефицитных мышей и MASP-1/3-дефицитных мышей, либо в традиционных АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), либо в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺).

На фиг. 18А графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение С3b в высокой степени разведенной сыворотке, проведенного на покрытых маннаном микротитрационных планшетах в традиционных АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), или в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0% до 1,25%. На фиг. 18В графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение С3b, проведенного на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в традиционных АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), или в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0 до 1,25%. На фиг. 18С графически проиллюстрированы результаты анализа на осаждение С3b, проведенного на покрытых *S.pneumoniae* D39 микротитрационных планшетах в традиционных АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), или в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺), с использованием сыворотки в концентрациях от 0 до 1,25%.

Как показано на фиг. 18А-С, анализы на осаждение С3b были также проведены в традиционных условиях, специфичных к альтернативному пути (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺), либо в физиологических условиях, обеспечивающих функционирование лектинового пути и альтернативного пути (т.е. BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺) с использованием более высоких разведений сыворотки от 0 до 1,25% на планшетах, покрытых маннаном (фиг. 18А); на планшетах, покрытых зимозаном (фиг. 18В) и на планшетах, покрытых *S.pneumoniae* D39 (фиг. 18С). Альтернативный путь блокировался при более высоких разведениях сыворотки, а поэтому активность, наблюдаемая в MASP-1/3-дефицитной сыворотке, в присутствии Ca⁺⁺, является MASP-2-опосредованной активностью ЛП, а активность в MASP-2-дефицитной сыворотке в присутствии Ca⁺⁺ является MASP-1/3-опосредованной остаточной активацией АП.

Обсуждение.

Результаты, описанные в этом примере, показали, что ингибитор MASP-2 (или MASP-2-НК) обеспечивает значительную защиту от инфекции *N.meningitidis*, посредством стимуляции активации альтернативного пути, индуцируемой MASP-3. Результаты анализов на бактериолиз мышинной сыворотки и анализов на бактериолиз человеческой сыворотки также показали, благодаря мониторингу бактерицидной активности сыворотки против *N.meningitidis*, что бактерицидная активность против *N.meningitidis* отсутствует у MBL-дефицитных мышей (в мышинной сыворотке, дефицитной по MBL А и MBL С и в человеческой MBL-дефицитной сыворотке).

На фиг. 1 проиллюстрировано новое понимание лектинового пути и альтернативного пути на основе результатов, приведенных в настоящем описании. На фиг. 1 показана роль LEA-2 в опсонизации и лизисе. Помимо того, что MASP-2 является инициатором "последующего" осаждения С3b (и в конечном счете, опсонизации) в нескольких лектин-зависимых физиологических процессах (фиг. 18А, 18В, 18С), он также играет определенную роль в лизисе чувствительных к сыворотке бактерий. Как показано на фиг. 1, предлагаемый молекулярный механизм, ответственный за повышенную бактерицидную активность MASP-2-дефицитной или MASP-2-обедненной сыворотки/плазмы в отношении чувствительных к сыворотке патогенов, таких как *N.meningitidis*, заключается в том, что для лизиса бактерий, комплексы распознавания лектинового пути, ассоциированные с MASP-1 и MASP-3, должны тесно связываться друг с другом на бактериальной поверхности, что позволит MASP-1 расщеплять MASP-3. В отличие от MASP-1 и MASP-2, MASP-3 не является аутоактивирующим ферментом, и во многих случаях, для его превращения в ферментативно активную форму, ему требуется активация/расщепление под действием MASP-1.

Как дополнительно показано на фиг. 1, активированный MASP-3 может затем расщеплять связан-

ный с C3b фактор В на поверхности патогена с инициацией альтернативного каскада реакций активации благодаря образованию ферментативно активных C3- и C5-конвертаз альтернативного пути C3bBbC3bBb и C3bBb(C3b)n, соответственно. MASP-2-несущие комплексы активации лектинового пути не участвуют в активации MASP-3 и, в отсутствие MASP-2 или после истощения MASP-2, все комплексы активации лектинового пути будут нагружены либо MASP-1, либо MASP-3. Таким образом, в отсутствие MASP-2, значительно увеличивается вероятность того, что на микробной поверхности, MASP-1- и MASP-3-несущие комплексы активации лектинового пути будут располагаться в непосредственной близости друг к другу, что будет приводить к большей активации MASP-3, и, тем самым, к повышению скорости MASP-3-опосредованного расщепления фактора В, связанного с C3b, с образованием C3- и C5-конвертаз альтернативного пути C3bBbC3bBb и C3bBbC3bBb(C3b)n на микробной поверхности. Это приводит к активации терминальных каскадов активации C5b-C9, которые образуют мембрано-атакующий комплекс, состоящий из поверхностно-связанного C5b, ассоциированного с C6; C5bC6, ассоциированного с C7; C5bC6C7, ассоциированного с C8; и C5bC6C7C8, что будет приводить к полимеризации C9, который встраивается в структуру бактериальной поверхности и образует поры в стенках бактерий, что будет приводить к осмотическому лизису бактерий, являющейся мишенью для этого комплемента.

Сущность этой новой концепции заключается в том, что представленные здесь данные со всей очевидностью показали, что комплексы активации лектинового пути запускают два последующих различных пути активации, как показано на фиг. 1.

Пример 5.

В этом примере продемонстрировано ингибирующее действие дефицита MASP-2 и/или дефицита MASP-3 на лизис эритроцитов, выделенных из проб крови, взятых у мышей с моделью пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).

Предпосылки/Обоснование.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), иногда также называемая синдромом Марчафа-вы-Михаэля, представляет собой приобретенное и опасное для жизни заболевание крови, характеризующееся комплемент-индуцированной внутрисосудистой гемолитической анемией. Отличительной чертой ПНГ является хронический комплемент-опосредованный внутрисосудистый гемолиз, вызываемый нерегулируемой активацией комплемента альтернативного пути из-за отсутствия регуляторов CD55 и CD59 комплемента на эритроцитах при ПНГ 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 ПНГ обусловлена разрушением эритроцитов в кровотоке. Симптомами ПНГ являются покраснение мочи, вызываемое присутствием гемоглобина в моче, боли в спине, усталость, одышка и тромбоз. ПНГ может развиваться сама по себе, и в этом случае она называется "первичной ПНГ", либо, если она развивается на фоне других заболеваний костного мозга, таких как апластическая анемия, ее называют "вторичной ПНГ". Лечение ПНГ включает переливание крови при анемии, использование антикоагулянтов при тромбозе и использование моноклонального антитела экулизумаба (Soliris®), который защищает клетки крови от иммунной деструкции посредством ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med.* 350(6):552-559 (2004)). Экулизумаб (Soliris®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое нацелено на компонент C5 комплемента, блокируя его расщепление C5-конвертазами и, предотвращая тем самым, продуцирование C5a и сборку MAC. Лечение пациентов с ПНГ экулизумабом приводит к снижению внутрисосудистого гемолиза, как было определено по уровню лактатдегидрогеназы (LDH), и тем самым, к стабилизации гемоглобина и отсутствию необходимости переливания крови приблизительно у половины пациентов (Risitano et al., *Mini Reviews in Med Chem.*, 11:528-535 (2011)). Хотя почти у всех пациентов, проходивших терапию экулизумабом, наблюдались нормальные или почти нормальные уровни LDH (за счет регуляции внутрисосудистого гемолиза), однако, только приблизительно у одной трети пациентов уровень гемоглобина достигал приблизительно 11 г/дл, тогда как у остальных пациентов, проходивших терапию экулизумабом, наблюдались умеренная или тяжелая (т.е. требующая переливания крови) анемия, почти в равных соотношениях (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Как описано в публикации (Risitano et al., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(6) (2011)), было продемонстрировано, что у пациентов с ПНГ, которым вводили экулизумаб, наблюдалось большое количество фрагментов C3, связанных с ПНГ-эритроцитами (а у пациентов, не проходивших лечения, этого не наблюдалось), что позволило сделать вывод, что мембраносвязанные фрагменты C3 действуют как опсоины, в результате чего происходит их захват ретикулоэндотелиальными клетками посредством специфических рецепторов C3 и последующий внесосудистый гемолиз.

Следовательно, помимо использования экулизумаба, необходимо разработать терапевтические стратегии для тех пациентов, у которых развивается внесосудистый гемолиз, опосредуемый фрагментом C3, поскольку этим пациентам по-прежнему требуется переливание эритроцитов.

В данном примере описаны способы оценки влияния MASP-2- и MASP-3-дефицитной сыворотки на лизис эритроцитов проб крови, взятых у мышей с моделью ПНГ, и была продемонстрирована эффективность ингибирования MASP-2 и/или ингибирования MASP-3 для лечения индивидуумов, страдающих ПНГ, а также была подтверждена возможность использования ингибиторов MASP-2 и/или ингибиторов

MASP-3 (включая ингибиторы двойного действия MASP-2/MASP-3 или биспецифические ингибиторы MASP-2/MASP-3) для ослабления эффектов внесосудистого гемолиза, опосредованного фрагментом C3, у индивидуумов с ПНГ, проходящих лечение ингибитором C5, таким как экулизумаб.

Методы.

Животные с моделью ПНГ.

Пробы крови были взяты у мышей с таргетированным геном и с дефицитом Cтгу и C3 (Cтгу/C3^{-/-}) и у CD55/CD59-дефицитных мышей. У этих мышей отсутствовали соответствующие регуляторы комплемента на поверхности эритроцитов, и следовательно, эти эритроциты были восприимчивы к спонтанному автолизу комплемента, поскольку они представляют собой клетки крови человека с ПНГ.

Для еще большей сенсibilизации этих эритроцитов данные клетки были использованы с маннано-вым покрытием и без этого покрытия, а затем они были протестированы на гемолиз в плазме мышей C56/BL6 дикого типа, в плазме мышей без MBL, в MASP-2^{-/-}-плазме, в MASP-1/3^{-/-}-плазме, в человеческой NHS, в человеческой MBL^{-/-}-плазме, и в NHS, обработанной человеческим анти-MASP-2 антителом.

1. Анализ на гемолиз мышинных эритроцитов, дефицитных по двум Cтгу/C3 и CD55/CD59, в MASP-2-дефицитной/истощенной сыворотке и у контроля.

День 1. Получение мышинных эритроцитов (± маннановое покрытие).

Включенные реагенты: свежая мышинная кровь, BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ (4,4 mM барбитуровой кислоты, 1,8 mM натрий-содержащего барбитона, 145 mM NaCl, pH 7,4, 5 mM Mg⁺⁺, 5 mM Ca⁺⁺), хлорид хрома, CrCl₃·6H₂O (0,5 мг/мл в BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺) и маннан, 100 мкг/мл в BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺.

Цельную кровь (2 мл) центрифугировали в течение 1-2 мин при 2000× g в рефрижераторной центрифуге при 4°C. Плазму и лейкоцитарную пленку подвергали аспирации. Затем пробу три раза промывали путем ресуспендирования осадка эритроцитов в 2 мл охлажденного льдом BBS/желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ и повторения стадии центрифугирования. После третьей промывки осадок ресуспендировали в 4 мл BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺. 2 мл-аликвоту эритроцитов откладывали в сторону как контроль без покрытия. К оставшимся 2 мл добавляли 2 мл CrCl₃ и 2 мл маннана, а затем образец инкубировали, слегка помешивая, при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакцию прекращали путем добавления 7,5 мл BBS/желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺. Пробу центрифугировали как описано выше, ресуспендировали в 2 мл BBS/желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ и промывали еще два раза как описано выше, а затем хранили при 4°C.

День 2. Анализ на гемолиз.

Включенные материалы: BBS/желатин/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ (как указано выше), тестируемая сыворотка, 96-луночные круглодонные и плоскодонные планшеты и спектрофотометр, который считывает 96-луночные планшеты на 410-414 нм.

Сначала определяли концентрацию эритроцитов, и клетки доводили до 10⁹/мл, а затем хранили при этой концентрации. Клетки перед их использованием разводили в буфере для анализа до 10⁸/мл, а затем использовали в концентрации 100 мкл на лунку. Уровень гемолиза определяли на 410-414 нм (что дает большую чувствительность, чем на 541 нм). Разведения тестируемой сыворотки получали в охлажденном льдом BBS/желатине/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺. 100 мкл каждого разведения сыворотки пипетировали в круглодонный планшет. Затем добавляли 100 мкл соответствующим образом разведенного препарата эритроцитов (т.е. 10⁸/мл), инкубировали при 37°C в течение приблизительно 1 ч и наблюдали за лизисом. (На момент лизиса планшеты могут быть сфотографированы). Затем планшет центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 мин. 100 мкл жидкой фазы отсасывали, переносили в плоскодонные планшеты и регистрировали ОП на 410-414 нм. Осадок эритроцитов сохраняли (эти эритроциты могут быть затем подвергнуты лизису под действием воды для получения обратного результата).

Эксперимент #1.

Свежую кровь брали у мышей, дефицитных по двум CD55/CD59, а кровь мышей, дефицитных по двум Cтгу/C3, и эритроциты получали как подробно описано в приведенном выше протоколе. Клетки разделяли и половину клеток покрывали маннаном, а другую половину оставляли в необработанном виде и доводили до конечной концентрации 10⁸/мл, из которых 100 мкл использовали в анализе на гемолиз, который осуществляли как описано выше.

Результаты эксперимента #1. Лектиновый путь участвует в лизисе эритроцитов у животных с моделью ПНГ.

В первоначальном эксперименте было установлено, что у мышей дикого типа, эритроциты без покрытия не подвергались лизису ни в одной мышинной сыворотке. Кроме того, было определено, что покрытые маннаном эритроциты Cтгу^{-/-}-мышей медленно подвергались лизису (более 3 ч при температуре 37°C) в сыворотке мышей дикого типа, но они не подвергались лизису в сыворотке без MBL. (Данные не приводятся).

Было установлено, что покрытые маннаном эритроциты Cтгу^{-/-}-мышей быстро подвергались лизису в человеческой сыворотке, но не в термоинактивированной NHS. Важно отметить, что покрытые маннаном эритроциты Cтгу^{-/-}-мышей подвергались лизису в NHS, разведенной до 1/640 (т.е. все разведения 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640 подвергались лизису). (Данные не приводятся). В этом разведении, альтернативный путь не работает (функциональная активность АП значительно снижается ниже 8%-ной

концентрации сыворотки).

Выводы из эксперимента #1.

Покрытые маннаном эритроциты Crgy^{-/-}-мышей очень хорошо лизировали в высокой степени разведенной человеческой сыворотке крови с MBL, но не в сыворотке без MBL. Эффективный лизис в сыворотке при каждой тестируемой концентрации показал, что альтернативный путь не участвует в этом лизисе или не является необходимым для такого лизиса. Неспособность MBL-дефицитной мышинной сыворотки и человеческой сыворотки к лизису покрытых маннаном эритроцитов Crgy^{-/-}-мышей указывает на то, что классический путь также не ассоциируется с наблюдаемым лизисом. Поскольку для распознавания лектинового пути необходимы определенные молекулы (т.е. MBL), то этот лизис опосредуется лектиновым путем.

Эксперимент #2.

Свежую кровь брали у мышей, дефицитных по двум Crgy/C3 и CD55/CD59, и покрытые маннаном эритроциты Crgy^{-/-}-мышей анализировали в анализе на гемолиз, как описано выше, в присутствии нижеследующих человеческих сывороток: MASP-3^{-/-}-сыворотки, сыворотки без MBL, сыворотки дикого типа; NHS, предварительно обработанной человеческий анти-MASP-2 антителом, и термоинактивированной NHS в качестве контроля.

Результаты эксперимента #2: ингибиторы MASP-2 и дефицит MASP-3 предотвращают лизис эритроцитов у животных с моделью ПНГ.

В случае покрытых маннаном эритроцитов Crgy^{-/-}-мышей NHS инкубировали в разведениях до 1/640 (т.е. 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640) для человеческой MBL^{-/-}-сыворотки, человеческой MASP-3-дефицитной сыворотки (от ЗМС-пациента), NHS, предварительно обработанной анти-MASP-2 mAb, и термоинактивированной NHS в качестве контроля.

Микротитрационный ELISA-планшет центрифугировали и нелизированные эритроциты собирали на дне планшета с круглыми лунками. Супернатант каждой лунки собирали и количество гемоглобина, высвобождаемого из лизированных эритроцитов, определяли путем считывания ОП на 415 нм в ELISA-ридере.

Было отмечено, что MASP-3^{-/-}-сыворотка вообще не лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты. В контрольной термоинактивированной NHS (негативный контроль), как и ожидалось, лизиса не наблюдалось. Человеческая MBL^{-/-}-сыворотка лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты при разведениях 1/8 и 1/16. NHS, предварительно обработанная анти-MASP-2-антителом, лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты при разведениях 1/8 и 1/16, тогда как человеческая сыворотка дикого типа лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты при разведениях до 1/32.

На фиг. 19 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами (Crgy/C3^{-/-}) в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном мышинных эритроцитов человеческой сывороткой при разведениях MASP-3^{-/-}-сыворотки, термоинактивированной (HI) NHS, MBL^{-/-}-сыворотки, NHS, предварительно обработанной анти-MASP-2 антителом, и NHS-контроля.

На фиг. 20 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами (Crgy/C3^{-/-}) в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном мышинных эритроцитов человеческой сывороткой при определенных концентрациях MASP-3^{-/-}-сыворотки, термоинактивированной (HI) NHS, MBL^{-/-}-сыворотки, NHS, предварительно обработанной анти-MASP-2 антителом, и NHS-контроля.

Исходя из результатов, представленных на фиг. 19 и 20, было продемонстрировано, что ингибирование MASP-3 будет предотвращать любой опосредованный комплементом лизис сенсibilизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологичной активации комплемента. Ингибирование MASP-2 под действием анти-MASP-2 антитела значительно изменяет CH₅₀ и является до некоторой степени протективным, но ингибирование MASP-3 было более эффективным.

Эксперимент #3.

Мышинные Crgy^{-/-}-эритроциты без покрытия, взятые из свежей крови мышей, дефицитных по двум Crgy/C3 и CD55/CD59, анализировали в анализе на гемолиз, как описано выше, в присутствии нижеследующих сывороток: MASP-3^{-/-}-сыворотки, сыворотки без MBL, сыворотки дикого типа; NHS, предварительно обработанной человеческий анти-MASP-2 антителом, и термоинактивированной NHS в качестве контроля.

Результаты.

На фиг. 21 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными мышинными эритроцитами дикого типа в супернатант посредством фотометрии) мышинных эритроцитов без покрытия при определенных концентрациях человеческой сыворотки, а именно, сыворотки ЗМС-пациента (MASP-3^{-/-}-сыворотки); термоинактивированной (HI) NHS, MBL^{-/-}-сыворотки, NHS, предварительно обработанной анти-MASP-2 антителом, и NHS-контроля. Как показано на фиг. 21 и систематизировано в табл. 13, было продемонстрировано, что ингибирование MASP-3 ингибирует комплемент-опосредуемый лизис несенсибилизированных мышинных эритроцитов дикого типа.

На фиг. 22 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина

лизированными мышинными эритроцитами (CD55/59-/-) в супернатант посредством фотометрии) мышинных эритроцитов без покрытия при определенных концентрациях человеческой сыворотки, а именно, термоинактивированной (HI) NHS, MBL^{-/-}-сыворотки, NHS, предварительно обработанной анти-MASP-2 антителом, и NHS-контроля. Как показано на фиг. 22 и систематизировано в табл. 13, было продемонстрировано, что ингибирование MASP-2 является в ограниченной степени протективным.

Таблица 13. Величины CH₅₀, выраженные как концентрация сыворотки

Сыворотка	Дикого типа	CD55/59 -/-
ЗМС-пациент	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует
Термоинактивированная NHS	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует
Донор MBL АО/XX (MBL-дефицитный)	7,2%	2,1%
NHS+анти-MASP-2 антитело	5,4%	1,5%
NHS	3,1%	0,73%

Примечания: "CH₅₀" представляет собой момент времени, когда комплемент-опосредованный гемолиз достигает 50%.

В целом, результаты этого примера показали, что ингибирование MASP-3 предотвращает любой лизис комплемента сенсibilизированных и несенсibilизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологичной активации комплемента. Ингибирование MASP-2 также является протективным, но до определенной степени. Таким образом, ингибиторы MASP-2 и MASP-3, взятые отдельно или в комбинации (т.е. введенные одновременно или последовательно) или биспецифические ингибиторы или ингибиторы двух MASP-2/MASP-3 могут быть использованы для лечения пациентов, страдающих ПНГ, а также они могут быть использованы для ослабления (т.е. для ингибирования, предотвращения или ослабления тяжести) внесосудистого гемолиза у пациентов с ПНГ, проходящих лечение ингибитором C5, таким как экулизумаб (Soliris®).

Пример 6.

В этом примере описан анализ на гемолиз покрытых маннаном кроличьих эритроцитов для оценки лизиса в присутствии сыворотки мышей дикого типа или MASP-1/3^{-/-}-мышей.

Методы.

1. Анализ на гемолиз кроличьих эритроцитов (покрытых маннаном) в мышинной MASP-1/3-дефицитной сыворотке и в контрольной сыворотке дикого типа

День 1. Получение кроличьих эритроцитов.

Включенные реагенты: свежая кроличья кровь, BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ (4,4 mM барбитуровой кислоты, 1,8 mM натрий-содержащего барбитона, 145 mM NaCl, pH 7,4, 5 mM Mg⁺⁺, 5 mM Ca⁺⁺), BBS/ Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ с 0,1% желатина, хлорид хрома, содержащийся в буфере, т.е. CrCl₃·6H₂O (0,5 мг/мл в BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺) и маннан, 100 мкг/мл в BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺.

1) Цельную кроличью кровь (2 мл) распределяли по двум 1,5 мл-пробиркам Эппендорфа и центрифугировали в течение 3 мин при 8000 об/мин (приблизительно 5,9 RCF) в рефрижераторной центрифуге при 4°C. Осадок эритроцитов три раза промывали после ресуспендирования в охлажденном льдом BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺. После третьей промывки осадок ресуспендировали в 4 мл BBS/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺. 2 мл этой аликвоты добавляли в 15-мл пробирку Falcon и эти аликвоты использовали в качестве контроля без покрытия. Оставшиеся 2-мл аликвоты эритроцитов разводили в 2 мл буфера CrCl₃, добавляли 2 мл раствора маннана и суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, слегка помешивая. Реакцию прекращали путем добавления 7,5 мл BBS/0,1% желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ к смеси. Эритроциты осаждали и два раза промывали BBS/0,1% желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺, как описано выше. Суспензию эритроцитов хранили в BBS/0,1% желатине/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ при 4°C.

2) 100 мкл суспендированных эритроцитов разводили 1,4 мл воды и центрифугировали при 8000 об/мин (приблизительно 5,9 RCF) в течение 3 мин и ОП супернатанта довели до 0,7 на 541 нм (ОП, равная 0,7 на 541 нм, соответствует приблизительно 10⁹ эритроцитов/мл).

3) Ресуспендированные эритроциты разводили BBS/0,1% желатина/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ до концентрации 10⁸/мл.

4) Разведение тестируемой сыворотки приготавливали в охлажденном льдом BBS/желатине/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ и 100 мкл каждого разведения сыворотки пипетировали в соответствующую лунку круглодонного планшета. 100 мкл соответствующим образом разведенных эритроцитов (10⁸/мл) добавляли в каждую лунку. В качестве контроля для оценки полного лизиса использовали очищенную воду (100 мкл), которую смешивали с разведенными эритроцитами (100 мкл) для инициации 100% лизиса, а в качестве негативного контроля использовали BBS/0,1% желатин/Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ без сыворотки (100 мкл). Затем планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

5) Круглодонный планшет центрифугировали при 3250 оборотов в минуту в течение 5 мин. Супернатант из каждой лунки (100 мкл) переносили в соответствующие лунки плоскостонного планшета и ОП считывали в ELISA-ридере на 415-490 нм. Результаты представлены как отношение оптической плотности на 415 нм к оптической плотности на 490 нм.

Результаты.

На фиг. 23 графически проиллюстрирован гемолиз (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов мышьиной MASP-3^{-/-}-сывороткой при определенных концентрациях сыворотки, взятой у MASP-1/3^{-/-} мышей и у контрольных мышей дикого типа. Как показано на фиг. 23, было продемонстрировано, что ингибирование MASP-3 предотвращает комплемент-опосредованный лизис покрытых маннаном кроличьих эритроцитов дикого типа. Эти результаты также подтверждают использование ингибиторов MASP-3 для лечения ПНГ одного или более видов, описанных в примере 5.

Пример 7.

В этом примере описано получение анти-MASP-1 и анти-MASP-3 моноклональных антител с использованием *in vitro*-системы, содержащей модифицированную клеточную линию DT40, DTLacO.

Предпосылки/Обоснование.

Антитела против человеческих MASP-1 и MASP-3 были получены с использованием *in vitro*-системы, содержащей модифицированную клеточную линию DT40, DTLacO, которая обеспечивает обратимое индуцирование диверсификации конкретного полипептида, как дополнительно описано в WO 2009029315 и US 2010093033. DT40 представляет собой куриную В-клеточную линию, в культуре которой, как известно, конститутивно мутируются гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина (Ig). Как и другие В-клетки, этот конститутивный мутагенез приводит к мутациям в V-области генов Ig, и тем самым в CDR экспрессированных молекул антитела. Конститутивный мутагенез в клетках DT40 происходит за счет конверсии генов, где в качестве донорных последовательностей служит массив нефункциональных сегментов гена V (генов псевдо-V; ψV), расположенных выше каждой функциональной V-области. Уже известно, что делеция области ψV вызывает переключение механизма диверсификации от конверсии гена на соматическую гипермутацию, т.е. механизм, обычно наблюдаемый в человеческих В-клетках. Было показано, что лимфома куриной В-клеточной линии DT40 представляют собой перспективную исходную точку для вырабатывания антител *ex vivo* (Cumbers S.J. et al. Nat. Biotechnol. 20, 1129-1134 (2002); Seo H. et al. Nat. Biotechnol. 23, 731-735 (2005)). Клетки DT40 пролиферируются только в культуре, причем время их удвоения составляет 8-10 часов (по сравнению с 20-24 ч для человеческих В-клеточных линий), и они поддерживают очень эффективный таргетинг гомологичного гена (Buerstedde J.M. et al. Embo J. 9, 921-927 (1990)). Клетки DT40 регулируют патологическую диверсификацию потенциальных последовательностей V-области при условии, что они могут сообщать доступ к двум различным физиологическим путям для диверсификации, конверсии гена и соматических гипермутаций, которые создают матричные и нематричные мутации, соответственно (Maizels N. Annu. Rev. Genet. 39, 23-46 (2005)).

Диверсифицированные иммуноглобулины тяжелой и легкой цепей (Ig) экспрессируются в форме IgM на клеточной поверхности. Поверхностный IgM имеет двухвалентную форму, напоминающую по структуре молекулу IgG. Клетки, которые представляют IgM со специфичностью к конкретному антигену, могут быть выделены путем связывания иммобилизованных растворимых или мембранных вариантов антигена. Однако использование клеток DT40 для вырабатывания антител на практике пока ограничено, поскольку, как и в других трансформированных В-клеточных линиях, диверсификация наблюдается на уровне менее 1% от физиологического уровня.

В системе, используемой в этом примере, как описано в WO 2009029315 и US 2010093033, клетки DT40 были сконструированы для ускорения степени диверсификации генов Ig без снижения способности к дальнейшей генетической модификации или потенциальной конверсии генов и соматической гипермутации, способствующих мутагенезу. Были введены две ключевых модификации DT40 для повышения степени диверсификации и, следовательно, для повышения разнообразия специфичностей связывания в библиотеке клеток, созданной авторами. Во-первых, диверсификация гена Ig находится под контролем активной регуляторной сети оператора/репрессора лактозы *E.coli*. Мультимеры, состоящие приблизительно из 100 полимеризованных повторов активного оператора лактозы *E.coli* (PolyLacO), были встроены выше реаранжированных и экспрессированных генов Ig λ , и IgH путем таргетинга гомологичных генов. Регуляторные факторы, присоединенные к белку-репрессору лактозы (LacI), могут быть затем присоединены к регуляторным элементам LacO для регуляции диверсификации с учетом высокой аффинности ($K_D=10^{-14}$ M) репрессора лактозы к ДНК оператора. Клетки DT40 PolyLacO- λ_R , в которых PolyLacO был интегрирован только в Ig λ , имеют скорость диверсификации гена Ig, в 5 раз превышающую скорость диверсификации гена для родительских клеток DT40 перед любым их конструированием (Cumings W.J. et al. PLoS Biol. 5, e246 (2007)). Диверсификация также увеличивалась в клетках, сконструированных так, чтобы PolyLacO был нацелен на гены Ig λ и IgH ("DTLacO"). Клетки DTLacO, как было продемонстрировано, имеют скорость диверсификации, которая в 2,5-9,2 раза превышала скорость диверсификации для 2,8% характерных родительских линий DT40 PolyLacO- λ_R LacI-HP1. Таким образом, таргетинг элементов PolyLacO в генах тяжелой и легкой цепей ускорял диверсификацию в 21,7 раза по сравнению с родительской клеточной линией DT40. Присоединение регуляторных факторов к локусам Ig приводит не только к изменению частоты мутагенеза, но также и к изменению пути мутагенеза и к созданию более

крупной коллекции уникальных последовательностей с модификациями (Cummings et al. 2007; Cummings et al. 2008). Во-вторых, был создан диверсифицированный набор исходных точек последовательностей для диверсификации гена Ig, ускоримой под действием присоединенного фактора. Эти различные исходные точки последовательности были добавлены к DTLacO путем таргетинга реаранжированных переменных областей тяжелой цепи Ig, выделенных у двухмесячных кур, в локусе тяжелой цепи. Добавление переменных областей тяжелой цепи позволяет получить репертуар из 10^7 новых исходных точек для диверсификации антител. Создание этих новых исходных точек в клеточной линии DTLacO позволяет идентифицировать клоны, которые связываются с конкретной мишенью с последующим быстрым созреванием аффинности связывания с присоединенными факторами. После созревания аффинности, полноразмерный рекомбинантный химерный IgG получают путем клонирования зрелых реаранжированных последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепи (VH и VL, состоящих из куриных каркасных областей и гиперпеременных областей или CDR), в экспрессионные векторы, содержащие человеческие константные области IgG1 и константные области лямбда. Эти рекомбинантные mAb являются подходящими для их применения *in vitro* и *in vivo* и служат в качестве исходной точки для гуманизации.

Методы.

Отбор на связывание с антигенами MASP-1 и MASP-3 Первоначальный отбор проводили путем связывания популяций DTLacO, диверсифицированных путем таргетинга гена, со сферами, образующими комплекс с человеческими антигенами MASP-1 (SEQ ID NO: 8) и MASP-3 (SEQ ID NO: 2); а последующий отбор проводили с помощью FACS с использованием флуоресцентно-меченного растворимого антигена (Cumbers S.J. et al. Nat. Biotechnol. 20, 1129-1134 (2002); Seo H. et al. Nat. Biotechnol. 23, 731-735 (2005). Поскольку консервативная аминокислотная последовательность присутствует в альфа-цепи, которая является общей для MASP-1 и MASP-3 (как показано на фиг. 2), но отличается от последовательностей бета-цепи (как показано на фиг. 2), то были проведены отдельные параллельные скрининги на связывание с MASP-1 и MASP-3 для идентификации MASP-1-специфических mAb, MASP-3-специфических mAb, а также mAb, способных связываться с MASP-1 и MASP-3 (биспецифических). Для отбора и скрининга на связывание были использованы антигены двух форм. Сначала рекомбинантный MASP-1 или MASP-3, либо в полноразмерной форме, либо в виде фрагмента, связанного с Fc-доменом, присоединяли к магнитным сферам с G-белком Dynal, либо использовали в способах отбора на основе FACS с использованием PEcy5-меченого "второго" антитела против человеческого IgG (Fc). Альтернативно, рекомбинантные варианты белков MASP-1 или MASP-3 были непосредственно помечены реагентом DyLight Fluors и использованы для отбора и скрининга.

Связывание и аффинность.

Рекомбинантные антитела были получены путем клонирования ПЦР-амплифицированных V-областей в вектор, который поддерживает экспрессию человеческого IgG1 в клетках 293F (Yabuki et al., PLoS ONE, 7(4):e36032 (2012)). Кинетику насыщенного связывания определяли путем окрашивания клеток DTLacO, экспрессирующих антитело, связывающееся с MASP-1 или MASP-3, различными концентрациями флуоресцентно меченого растворимого антигена. Функциональные анализы на MASP-3-специфическую активность, включая MASP-3-зависимое осаждение C3b и MASP-3-зависимое расщепление фактора D, осуществляли как описано в примерах 8 и 9, соответственно. Функциональный анализ на MASP-1-специфическую активность, а именно на ингибирование MASP-1-зависимого осаждения C3b проводили, как описано ниже.

Результаты.

Многочисленные MASP-1- и MASP-3-связывающие антитела были получены методами, описанными выше. Связывание, как было продемонстрировано с помощью FACS-анализа, описано для репрезентативных клонов M3J5 и M3M1, которые были выделены методом скрининга на связывание с MASP-3.

На фиг. 24А представлена FACS-гистограмма связывания антигена MASP-3/анти-MASP-3 антитела для клона DTLacO M3J5. На фиг. 24В представлена FACS-гистограмма связывания антигена MASP-3/анти-MASP-3 антитела для клона DTLacO M3M1. На фиг. 24А и 24В, заштрихованные серым кривые соответствуют IgG1-окрашенному негативному контролю, а жирные черные кривые соответствуют MASP-3-окрашиванию.

На фиг. 25 графически проиллюстрирована кривая насыщенного связывания клона M3J5 (клона 5) с антигеном MASP-3. Как показано на фиг. 25, кажущаяся аффинность связывания антитела M3J5 с MASP-3 составляет приблизительно 31 нМ.

Анализ последовательностей идентифицированных клонов проводили стандартными методами. Все клоны сравнивали с общими последовательностями VH и VL (DT40) и друг с другом. Последовательности двух вышеупомянутых клонов M3J5 и M3M1 выравнивали с двумя дополнительными репрезентативными клонами D14 и 1E10, которые были идентифицированы путем скрининга на фрагменты CCP1-CCP2-SP MASP-1 и MASP-3, соответственно. D14 и 1E10 связываются с областями, которые являются общими для обоих MASP-1 и MASP-3.

На фиг. 26А проиллюстрировано выравнивание аминокислотных последовательностей VH-областей M3J5, M3M1, D14 и 1E10 с последовательностью VH куриных DT40.

На фиг. 26В проиллюстрировано выравнивание аминокислотных последовательностей VL-областей M3J5, M3M1, D14 и 1E10 с последовательностью VL куриных DT40.

Аминокислотные последовательности VH и VL каждого клона представлены ниже.

Последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH).

На фиг. 26А проиллюстрировано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (VH) для родительского DTLacO (SEQ ID NO: 300), MASP-3-связывающих клонов M3J5 (SEQ ID NO: 301) и M3M1 (SEQ ID NO: 302), и клонов, связывающихся с двумя MASP-1/MASP-3, D14 (SEQ ID NO: 306) и 1E10 (SEQ ID NO: 308).

CDR в последовательностях VH, пронумерованные по Кэбату и представленные ниже, локализованы в нижеследующих положениях аминокислот: H1: а.к. 31-35; H2: а.к. 50-62; и H3: а.к. 95-102.

CDR в последовательностях VH, пронумерованные по Чотию и представленные ниже, локализованы в нижеследующих положениях аминокислот: H1: а.к. 26-32; H2: а.к. 52-56; и H3: а.к. 95-101.

VH родительского DTLacO: (SEQ ID NO: 300)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDDDGSGTRYAPA
VKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYCTKCAYSGCCDYEGGYIDAWGHGTEVIVSS

VH клона M3J5: (SEQ ID NO: 301)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFSSYAMGWMRQAPGKGLEWVAGIRSDGSFTLYATA
VKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYFCTRSGNVGDIDAWGHGTEVIVSS

VH клона M3M1: (SEQ ID NO: 302)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDSSYQMNWIRQAPGKGLEFVAAINRFGNSTGHGAAY
KGRVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTATYYCAKGVYGYCGSYSCCGVDTIDAWGHGTE VIVSS

VH клона D14: (SEQ ID NO: 306)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAGIYKSGAGTNYAPA
VKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYCAKTTGSGCSSGYRAEYIDAWGHGTEVI VSS

VH клона 1E10: (SEQ ID NO: 308)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMVWVRQAPGKGLEFVAGISRNDGRYTEYGSA
VKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARDAGGSAYWFDAGQIDAWGHGTEVIVSS

Последовательности вариабельной области легкой цепи (VL).

На фиг. 26В проиллюстрировано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи (VL) для родительского DTLacO (SEQ ID NO: 303), MASP-3-связывающих клонов M3J5 (SEQ ID NO: 304) и M3M1 (SEQ ID NO: 305), и клонов, связывающихся с двумя MASP-1/MASP-3, D14 (SEQ ID NO: 307) и 1E10 (SEQ ID NO: 309).

VL родительского DTLacO: (SEQ ID NO: 303)

ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIP
SRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTTLTVL

VL клона M3J5: (SEQ ID NO: 304)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDI
PSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTTLTVL

VL клона M3M1: (SEQ ID NO: 305)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIP
SRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTTLTVL

VL клона D14: (SEQ ID NO: 307)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIP
SRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTTLTVL

VL клона 1E10: (SEQ ID NO: 309)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIP
SRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTTLTVL

Функциональный анализ на LEA-2 (MASP-2-зависимый).

MASP-1 вносит свой вклад в LEA-2 благодаря своей способности активировать MASP-2 (см. фиг. 1). Анализ методом скрининга MBL системы комплемента Wieslab® (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden) позволяет измерить степень осаждения C5b-C9 в условиях ингибирования LEA-2-зависимой активации (т.е. активности традиционного лектинового пути). Этот анализ осуществляли в соответствии с инструкциями производителей с использованием репрезентативного клона 1E10, тестируемого в конечной концентрации 400 нМ.

На фиг. 27 представлена гистограмма, иллюстрирующая ингибирующую активность mAb 1E10 по сравнению с позитивной сывороткой, имеющейся в наборе для анализа, а также ингибирующую активность антитела контрольного изотипа. Как показано на фиг. 27, mAb 1E10 частично ингибирует LEA-2-зависимую активацию (посредством ингибирования MASP-1-зависимой активации MASP-2), тогда как антитело контрольного изотипа не обладает такой активностью. Более сильное ингибирование должно быть достигнуто путем непрерывного созревания аффинности связывания антитела с MASP-1 с использованием присоединенных факторов в системе DTLacO.

Функциональный анализ на LEA-1 (MASP-3-зависимый) для репрезентативных mAb описан ниже в

примерах 8 и 9.

Краткое изложение результатов.

Представленные выше результаты показали, что на основе DTLacO можно быстро обнаруживать *ex vivo* антитела против MASP-1 и MASP-3 с ингибирующими свойствами в отношении LEA-1 (как показано ниже в примерах 8 и 9) и LEA-2 (как показано в этом примере).

Пример 8.

Анализ пути комплемента в ЗМС-сыворотке с *S. aureus*.

Предпосылки/Обоснование.

Было установлено, что MASP-3 не активируются под действием неиммобилизованного жидкофазного маннана, зимозана А или N-ацетилцистеина в присутствии или в отсутствии нормальной человеческой сыворотки. Тем не менее, было установлено, что рекомбинантный и нативный MASP-3 активируются на поверхности термоинактивированного *S. aureus* в присутствии и в отсутствии нормальной человеческой сыворотки (NHS) или термоинактивированной человеческой сыворотки (HIS) (данные не приводятся). Было также установлено, что осаждение C3b происходит на поверхности *S. aureus* в присутствии нормальной человеческой сыворотки, и что осаждение можно контролировать с помощью проточного цитометра. Таким образом, ответ альтернативного пути (АП) на *S. aureus* оценивали, как описано в качестве средства для оценки вклада MASP-3 в LEA-1.

Методы.

Рекомбинантный MASP-3.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный рекомбинантный человеческий MASP-3, усеченный активный вариант сериновой протеазы (SP) MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) и SP-инактивированную форму MASP-3 (S679A), были клонированы в экспрессионный вектор млекопитающих pTgEx7 (Invivogen). Полученные экспрессионные конструкции кодируют полноразмерный MASP-3 или его фрагмент CCP1-CCP2-SP с аминоконцевой меткой Streptag и карбокси-концевой His₆-меткой. Экспрессионные конструкции трансфицировали в клетки Freestyle 293-F или в клетки Expi293F (Invitrogen) в соответствии с протоколами, предоставленными производителем. После 3-4-дневного культивирования в 5% CO₂ при 37°C, рекомбинантные белки очищали с помощью аффинной хроматографии на стрептактине.

Рекомбинантный MASP-1.

Полноразмерные или усеченные формы CCP1-CCP2-SP рекомбинантного MASP-1 с добавлением или без добавления стабилизирующего R504Q (Dobo et al., J. Immunol. 183:1207, 2009) или SP-инактивирующие (S646A) мутации вместе с аминоконцевой меткой Steptag и карбокси-концевой His₆-меткой были получены как описано выше для рекомбинантного MASP-3.

1. Осаждение C3b и расщепление фактора В на *S. aureus* в ЗМС-сыворотке (человеческой).

Первый эксперимент был проведен для того, чтобы продемонстрировать, что проточный цитометрический анализ позволяет детектировать присутствие или отсутствие АП-индуцированного осаждения C3b (АП-C3b) следующим образом. Пять процентов следующих сывороток: нормальной человеческой сыворотки; человеческой сыворотки, не содержащей фактора В; человеческой сыворотки, не содержащей фактора D; и человеческой сыворотки, не содержащей пропердина (полученной от Complement Technology, Tyler, Texas, USA), смешивали с тестируемым антителом либо в Mg⁺⁺/EGTA-буфере, либо в EDTA при 4°C в течение ночи. К каждой смеси добавляли термоинактивированные *S. aureus* (10⁸/реакционная смесь) до общего объема 100 мкл и смесь подвергали круговому вращению при 37°C в течение 40 мин. Бактерии промывали в промывочном буфере, бактериальный осадок ресуспендировали в промывочном буфере, и 80 мкл-аликвоты каждого образца анализировали на осаждение C3b на бактериальной поверхности, которое детектировали с использованием антитела против человеческого C3c (Dako, UK) с помощью проточной цитометрии.

Результаты детектирования C3b с помощью проточной цитометрии представлены на фиг. 28А. Как показано на фиг. 28А, на панели 1, в нормальной человеческой сыворотке в присутствии EDTA, в которой, как известно, АП является неактивным, осаждения C3b не наблюдалось (негативный контроль). В нормальной человеческой сыворотке, обработанной Mg⁺⁺/EGTA, функционировали только лектин-независимые пути комплемента. На панели 2 с использованием Mg⁺⁺/EGTA-буфера, где АП является активным, наблюдалось АП-индуцированное осаждение C3b (позитивный контроль). Как показано на панелях 3, 4 и 5, в сыворотке, не содержащей фактора В, фактора D и пропердина, соответственно, какого-либо осаждения C3b, индуцированного альтернативным путем, как и предполагалось, не наблюдалось. Эти результаты продемонстрировали, что такой анализ способен детектировать АП-зависимое осаждение C3b.

Анализ на осаждение C3b на *S. aureus* проводили, как описано выше для оценки способности рекомбинантного MASP-3 восстанавливать путь АП (LEA-1) в человеческой ЗМС-сыворотке, дефицитной по MASP-3 (Rooryck C et al., Nat. Genet. 43 (3): 197-203 (2011)). Были протестированы следующие комбинации реагентов.

- 1) 5% нормальная человеческая сыворотка+EDTA.
- 2) 5% нормальная человеческая сыворотка+Mg/EGTA.

- 3) 5% человеческая ЗМС-сыворотка (MASP-3^{-/-})+Mg⁺⁺/EGTA.
- 4) 5% человеческая ЗМС-сыворотка (MASP-3^{-/-}) +Mg⁺⁺/EGTA+активный полноразмерный гMASP-3.
- 5) 5% человеческая ЗМС-сыворотка (MASP-3^{-/-})+Mg⁺⁺/EGTA+активный усеченный гMASP-3 (CCP1/CCP2/SP).

6) 5% человеческая ЗМС-сыворотка (MASP-3^{-/-})+Mg⁺⁺/EGTA+неактивный гMASP-3 (S679A).

7) 5% человеческая ЗМС-сыворотка (MASP-3^{-/-})+Mg⁺⁺/EGTA+активный полноразмерный гMASP-1.

Различные смеси 5% сыворотки и рекомбинантных белков (5 мкг каждого), как показано выше, инкубировали в указанных буферных условиях (либо в Mg⁺⁺/EGTA-буфере, либо в EDTA) при 4°C в течение ночи. После инкубирования в течение ночи, к каждой смеси добавляли 10⁸ термоинактивированных *S.aureus* до общего объема 100 мкл и смесь подвергали круговому вращению при 37°C в течение 40 мин. Бактерии промывали и ресуспендировали в промывочном буфере, а затем 80 мкл-аликвоту каждого образца анализировали на осаждение C3b с помощью FACS. Остальные 20-мкл аликвоты каждого образца использовали для оценки расщепления фактора В с помощью вестерн-блот-анализа с использованием антитела против фактора В, как описано ниже.

Результаты детектирования C3b с помощью проточной цитометрии представлены на фиг. 28В. Номера панелей соответствуют номерам, указанным для каждой комбинации реагентов, описанных выше. Негативный контроль (панель 1) и позитивный контроль (панель 2), как и предполагалось, указывают на отсутствие и наличие осаждения C3b. На панели 3 показано, что АП-индуцированное осаждение C3b отсутствовало в ЗМС-сыворотке. На панелях 4 и 5 показано, что активный полноразмерный гMASP-3 (панель 4) и активный гMASP-3 (CCP1-CCP2-SP) (панель 5) восстанавливают АП-индуцированное осаждение C3b в ЗМС-сыворотке. На панели 6 показано, что неактивный гMASP-3 (S679A) не восстанавливал АП-индуцированное осаждение C3b в ЗМС-сыворотке. На панели 7 показано, что гMASP-1 не восстанавливал АП-индуцированное осаждение C3b в ЗМС-сыворотке.

В целом, эти результаты показали, что MASP-3 необходим для АП-индуцированного осаждения C3b на *S.aureus* в человеческой сыворотке.

MASP-3-зависимая активация фактора В.

Для анализа MASP-3-зависимой активации фактора В, различные смеси 5% сыворотки (либо нормальной человеческой сыворотки, либо ЗМС-сыворотки пациента) и рекомбинантных белков, описанных выше, анализировали, как описано выше. От каждой реакционной смеси брали 20 мкл и добавляли в буфер для загрузки образцов белка. Образцы нагревали при 70°C в течение 10 мин и загружали на ДСН-ПААГ. Вестерн-блот-анализ проводили с использованием поликлонального антитела против фактора В (R&D Systems). Активация фактора В, очевидно, была обусловлена образованием двух продуктов расщепления с меньшей молекулярной массой (Bb и Ba), происходящих от белка про-фактора В с более высокой молекулярной массой.

На фиг. 29 представлены результаты вестерн-блот-анализа для определения расщепления фактора В в ответ на *S.aureus* в ЗМС-сыворотке в присутствии или в отсутствии гMASP-3. Как показано на дорожке 1, нормальная человеческая сыворотка в присутствии EDTA (негативный контроль) демонстрирует очень низкий уровень расщепления фактора В по сравнению с нормальной человеческой сывороткой в присутствии Mg⁺⁺/EGTA, как показано на дорожке 2 (позитивный контроль). Как показано на дорожке 3, ЗМС-сыворотка демонстрирует очень низкий уровень расщепления фактора В в присутствии Mg⁺⁺/EGTA. Однако, как показано на дорожке 4, расщепление фактора В поддерживается за счет добавления и предварительного инкубирования полноразмерного рекомбинантного белка MASP-3 (5 мкг) с ЗМС-сывороткой.

Анализ для определения влияния гMASP-3 на про-фактор D при расщеплении фактора В/С3 (H₂O).

В целях определения минимального требования для MASP-3-зависимой активации/расщепления фактора В был проведен следующий анализ.

C₃(H₂O) (200 нг), очищенный фактор В плазмы (20 мкг), рекомбинантный про-фактор D (200 нг) и рекомбинантный человеческий MASP-3 (200 нг) смешивали вместе в различных комбинациях (как показано на фиг. 30) в общем объеме 100 мкл в BBS/Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ и инкубировали при 30°C в течение 30 мин. Реакцию завершали добавлением 25 мкл красителя для загрузки ДСН, содержащего 5% 2-меркаптоэтанола. После кипячения при температуре 95°C в течение 10 мин со встряхиванием (300 оборотов в минуту), смесь центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин, а затем загружали 20 мкл супернатанта, и разделяли на 10% ДСН-геле. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым голубым.

Результаты.

На фиг. 30 показано кумасси-окрашивание ДСН-ПААГ-геля для анализа на расщепление фактора В. Как показано на дорожке 1, расщепление фактора В является наиболее оптимальным в присутствии C3, MASP-3 и про-фактора D. Как показано на дорожке 2, C3 является абсолютно необходимым, однако, как показано на дорожках 4 и 5, MASP-3 или про-фактор D способны опосредовать расщепление фактора В при условии, что будет присутствовать C3.

Анализ на способность анти-MASP-3 mAb ингибировать MASP-3-зависимое АП-индуцированное осаждение C3b.

Как описано в этом примере, было продемонстрировано, что MASP-3 необходим для АП-индуцированного осаждения C3b на *S.aureus* в человеческой сыворотке. Поэтому был проведен анализ

для того, чтобы определить, может ли репрезентативное анти-MASP-3 mAb, идентифицированное, как описано в примере 7, ингибировать активность MASP-3. Активный рекомбинантный фрагмент белка MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) (250 нг) предварительно инкубировали с mAb контрольного изотипа, с mAb1A5 (контрольного антитела, выделенного из клеточной линии DTLacO, и не связывающегося с MASP-3 или MASP-1), или с mAbD14 (связывающегося с MASP-3) в трех различных концентрациях (0,5, 2 и 4 мкМ) в течение 1 ч на льду. Смесь фермент-mAb обрабатывали 5% ЗМС-сывороткой (MASP-3-дефицитной) и 5×10^7 термоинактивированных *S.aureus* в конечном реакционном объеме 50 мкл. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин, а затем окрашивали для детектирования осаждения C3b. Окрашенные бактериальные клетки анализировали на проточном цитометре.

На фиг. 31 графически проиллюстрированы средние интенсивности флуоресценции (MFI) окрашивания C3b, полученные для трех антител и отложенные на графике в зависимости от концентрации mAb в ЗМС-сыворотке в присутствии rMASP-3. Как показано на фиг. 31, mAbD14 демонстрирует ингибирование осаждения C3b в зависимости от концентрации. В противоположность этому, ни одно из контрольных mAb не ингибирует осаждение C3b. Эти результаты показали, что mAbD14 способно ингибировать MASP-3-зависимое осаждение C3b. Как и ожидалось, повышение ингибирующей активности для mAbD14 является следствием длительного аффинного созревания этого антитела для связывания с MASP-3 посредством присоединенных факторов в системе DTLacO.

Краткое изложение результатов.

В целом, результаты этого примера продемонстрировали явное отсутствие АП в сыворотке, дефицитной по MASP-3. Таким образом, было продемонстрировано, что MASP-3 вносит значительный вклад в АП, на что указывала активация фактора В и осаждение C3b как функциональные конечные точки. Кроме того, добавление функционального рекомбинантного MASP-3, включая каталитически активную С-концевую часть MASP-3, устраняет дефект активации фактора В и осаждения C3b в сыворотке ЗМС-пациента. С другой стороны, как было также продемонстрировано в этом примере, добавление анти-MASP-3 антитела (например, mAbD14) в ЗМС-сыворотку с rMASP-3 ингибирует АП-индуцированное осаждение C3b. Непосредственная роль MASP-3 в активации фактора В, и, следовательно, АП, была продемонстрирована в результате наблюдения, указывающего на то, что рекомбинантный MASP-3, наряду с C3, является достаточным для активации рекомбинантного фактора В.

Пример 9.

В этом примере продемонстрировано, что MASP-1 и MASP-3 активируют фактор D.

Методы.

Рекомбинантный MASP-1 и MASP-3 были протестированы на их способность расщеплять два различных рекомбинантных варианта про-фактора D. Первый вариант (про-фактор D-His) не имеет N-концевой метки, но имеет С-концевую His-метку. Таким образом, этот вариант про-фактора D содержит пропептид из 5 аминокислот, который удаляется посредством расщепления в процессе активации. Вторым вариантом (ST-про-фактор D-His) имеет последовательность Strep-TagII на N-конце, что увеличивает расщепленный N-концевой фрагмент до 15 аминокислот. ST-про-фактор D также содержит His₆-метку у С-конца. Увеличение длины пропептида ST-про-фактора D-His улучшает разделение расщепленной и нерасщепленной формы с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ по сравнению с разделением, которое может быть возможным в случае про-фактора D-His.

Рекомбинантные белки MASP-1 или MASP-3 (2 мкг) добавляли к про-фактору D-His или к субстратам ST-про-фактора D-His (100 нг) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Реакционные смеси подвергали электрофорезу в 12% бис-трис-геле для разделения про-фактора D и продукта расщепления активного фактора D. Разделенные белки переносили на ПВДФ-мембрану и анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа для детектирования с использованием биотинилированного антитела против фактора D (R&D Systems).

Результаты.

На фиг. 32 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ на расщепление субстрата про-фактора D.

Таблица 14. Описание дорожек для вестерн-блот-анализа, проиллюстрированного на фиг. 32

Экспериментальные условия	Дорожка 1	Дорожка 2	Дорожка 3	Дорожка 4	Дорожка 5
Про-фактор D	+	+	+	+	+
rMASP-3 (полноразмерный)	—	+	—	—	—
rMASP-3a (S679A)	—	—	+	—	—
rMASP-1A (S646A)	—	—	—	+	—
rMASP-1 (CCP1-CCP2-SP)	—	—	—	—	+

Как показано на фиг. 32, только полноразмерными MASP-3 (дорожка 2) и фрагмент MASP-1 CCP1-

CCP2-SP (дорожка 5) расщепляют ST-про-фактор D-His₆. Каталитически неактивный полноразмерный MASP-3 (S679A; дорожка 3) и MASP-1 (S646A; дорожка 3) не обладали способностью расщеплять любой из этих субстратов. Идентичные результаты были получены для полипептида про-фактора D-His₆ (не показано). Сравнение молярного избытка MASP-1 (CCP1-CCP2-SP) и MASP-3 позволяет предположить, что MASP-3 является более эффективным катализатором расщепления про-фактора D, чем MASP-1, по меньшей мере в описанных здесь условиях.

Выводы. Оба MASP-1 и MASP-3 обладали способностью расщеплять и активировать фактор D. Эта активность устанавливает прямую взаимосвязь LEA-1 с активацией АП. Более конкретно, активация фактора D под действием MASP-1 или MASP-3 приводит к активации фактора В, к осаждению C3b, и, вероятно, к опсонизации и/или лизису.

Анализ на ингибирование MASP-3-зависимого расщепления про-фактора D под действием анти-MASP-3 антител.

Был проведен анализ для определения ингибирующего действия репрезентативных анти-MASP-3 и анти-MASP-1 mAb, идентифицированных как описано в примере 7, на MASP-3-зависимое расщепление фактора D. Активный рекомбинантный белок MASP-3 (80 нг) предварительно инкубировали с 1 мкг репрезентативных mAb D14, M3M1 и контрольного антитела (которое специфически связывается с MASP-1, но не с MASP-3) при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли про-фактор D с N-концевой Strep-меткой (ST-про-фактор D-His, 70 нг) и смесь инкубировали при 37°C в течение 75 мин. Затем реакционные смеси подвергали электрофорезу, блот-анализу и окрашивали антителом против фактора D, как описано выше.

На фиг. 33 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ, указывающий на частичную ингибирующую активность mAb D14 и M3M1 по сравнению с контрольной реакционной смесью, содержащей только MASP-3 и ST-про-фактор D-His (без mAb; дорожка 1), а также с контрольной реакционной смесью, содержащей mAb, выделенное из библиотеки DTLacO и связывающееся с MASP-1, но не с MASP-3 (дорожка 4). Как показано на фиг. 33, в отсутствие ингибирующего антитела, MASP-3 расщепляет приблизительно 50% про-фактора D с образованием фактора D (дорожка 1). Контрольное MASP-1-специфическое антитело (дорожка 4) не изменяет отношения про-фактора D к фактору D. В противоположность этому, как показано на дорожках 2 и 3, оба mAb D14 и mAb M3M1 ингибируют MASP-3-зависимое расщепление про-фактора D с образованием фактора D, что приводит к снижению уровня продуцирования фактора D.

Выводы. Эти результаты показали, что анти-MASP-3 mAb D14 и M3M1 способны ингибировать MASP-3-зависимое расщепление фактора D. Как и ожидалось, повышение ингибирующей активности для mAb D14 и M3M1 является следствием длительного аффинного созревания этого антитела для связывания с MASP-3 посредством присоединенных факторов в системе DTLacO.

Пример 10.

В этом примере продемонстрировано, что дефицит MASP-3 предотвращает комплемент-опосредованный лизис покрытых маннаном кроличьих эритроцитов дикого типа.

Предпосылки/Обоснование.

Как описано здесь в примерах 5 и 6, влияние MASP-2- и MASP-3-дефицитной сыворотки на лизис эритроцитов проб крови, взятых у мышей с моделью ПНГ, указывает на эффективность ингибирования MASP-2 и/или ингибирования MASP-3 для лечения индивидуумов, страдающих ПНГ, а также на возможность использования ингибиторов MASP-2 и/или ингибиторов MASP-3 (включая ингибиторы двойного действия MASP-2/MASP-3 или биспецифические ингибиторы MASP-2/MASP-3) для ослабления эффектов внесосудистого гемолиза, опосредованного фрагментом C3, у индивидуумов с ПНГ, проходящих лечение ингибитором C5, таким как экулизумаб.

Как описано в этом примере, эксперименты по осаждению C3b и по гемолизу проводили на MASP-3-дефицитной сыворотке, взятой у других ЗМС-пациентов, и эти эксперименты подтвердили результаты, полученные в примерах 5 и 6. Кроме того, были проведены эксперименты, которые показали, что добавление gMASP-3 к ЗМС-сыворотке способствовало восстановлению осаждения C3b и гемолитической активности.

Методы.

MASP-3-дефицитную сыворотку брали у следующих трех различных ЗМС-пациентов:

ЗМС-пациент 1. Этот пациент содержит аллель, несущий мутацию, которая сообщает экзону, кодирующему домен сериновой протеазы MASP-3, дисфункциональность, и такая дисфункциональность также наблюдается у матери и отца ЗМС-пациента (оба они являются гетерозиготными по аллелю, несущему мутацию, которая сообщает экзону, кодирующему домен сериновой протеазы MASP-3, дисфункциональность).

ЗМС-пациент 2. Этот пациент имеет мутацию C1489T (H497Y) в экзоне 12 MASP-1, т.е. в экзоне, который кодирует домен сериновой протеазы MASP-3, в результате чего MASP-3 становится нефункциональным, а белки MASP-1 становятся функциональными.

ЗМС-пациент 3. Этот пациент имеет подтвержденный дефект в гене MASP-1, в результате чего MASP-3 становится нефункциональным, и белки MASP-1 также становятся нефункциональными.

Эксперимент #1. Анализ на осаждение C3b.

Анализ АП осуществляли в традиционных АП-специфических условиях (BBS/Mg⁺⁺/EGTA, без Ca⁺⁺, где BB3=забуференный барбиталом физиологический раствор, содержащий сахарозу), как описано Bitter-Suermann et al., Eur. J. Immunol. 11:291-295 (1981)), на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах при концентрации сыворотки от 0,5 до 25%, и оценивали уровень осаждения C3b в течение определенного периода времени.

Результаты.

На фиг. 34 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации сыворотки в пробах сыворотки, взятых у индивидуумов с дефицитом MASP-3 (ЗМС), C4 и MBL. Как показано на фиг. 34 и систематизировано ниже в табл. 15, MASP-3-дефицитная сыворотка, взятая у пациента 2 и пациента 3, имеет остаточную АП-активность при высоких концентрациях в сыворотке (концентрации сыворотки 25, 12,5, 6,25%), и значительно более высокую АП₅₀ (т.е. для достижения 50% от максимального осаждения C3 необходима 8,2% и 12,3% сыворотка).

На фиг. 35А графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в "традиционных" АП-специфических условиях (т.е. BBS/EGTA/Mg⁺⁺ без Ca⁺⁺) в зависимости от времени в пробах 10% человеческой сыворотки, взятых у человека с дефицитом MASP-3, C4 и MBL.

Ниже в табл. 15 систематизированы результаты АП₅₀, представленные на фиг. 34, и период полуосаждения C3b, как показано на фиг. 35А.

Таблица 15. Краткое изложение результатов, представленных на фиг. 34 и 35А

Тип сыворотки	АП ₅₀ (%)	T _{1/2} (мин.)
Нормальная	4, 5	26, 3
MBL-дефицитная (MBL-/-)	5, 7	27, 5
C4-дефицитная (C4-/-)	5, 1	28, 6
ЗМС (Пациент 3)	8, 2	58, 2
ЗМС (Пациент 2)	12, 3	72, 4

Примечание: В BBS/Mg⁺⁺/EGTA-буфере, эффекты, опосредованные лектиновым путем, являются недостаточными из-за отсутствия Ca⁺⁺ в этом буфере.

Эксперимент #2. Анализ на расщепление про-фактора D в сыворотке ЗМС-пациента с помощью вестерн-блот-анализа.

Методы. Сыворотку брали у ЗМС-пациента #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) и у ЗМС-пациента #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)). Сыворотку пациента, вместе с сывороткой, взятой у здоровых доноров (W), разделяли в ДСН-полиакриламидном геле и разделенные белки подвергали блоттингу на поливинилиденфторидной мембране. Человеческий про-фактор D (25040 Да) и/или зрелый фактор D (24405 Да) детектировали с использованием антитела, специфичного к человеческому фактору D.

Результаты. Результаты вестерн-блот-анализа представлены на фиг. 35В. Как показано на фиг. 35В, в сыворотке здоровых доноров (W), антитело против фактора D детектировало белок, размер которого соответствует размеру зрелого фактора D (24405 Да). Как показано на фиг. 35В, антитело против фактора D детектировало несколько более крупный белок в сыворотке ЗМС-пациента #2 (P2) и ЗМС-пациента #3 (P3), что соответствовало присутствию про-фактора D (25040 Да) у этих ЗМС-пациентов.

Эксперимент #3. Анализы на комплемент Wieslab в сыворотке ЗМС-пациента.

Методы. Сыворотку, взятую у ЗМС-пациента #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) и у ЗМС-пациента #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), также тестировали на активность классического, лектинового и альтернативного путей методом скрининга системы комплемента Wieslab (Euro-Diagnostica, Malmo, Sweden) в соответствии с инструкциями производителей. Нормальную человеческую сыворотку тестировали параллельно в качестве контроля.

Результаты. На фиг. 35С графически проиллюстрированы результаты анализов на классический, лектиновый и альтернативный пути Wieslab с использованием плазмы, взятой у ЗМС-пациента #2, ЗМС-пациента #3, и нормальной человеческой сыворотки. Как показано на фиг. 35С, в условиях анализа Wieslab, классический, альтернативный и MBL-пути (лектиновый путь) являются функциональными в нормальной человеческой сыворотке. В сыворотке ЗМС-пациента #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)), классический путь и лектиновый путь являются функциональными, однако, активность альтернативного пути не детектировалась. В сыворотке ЗМС-пациента #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), классический путь является функциональным, а активность лектинового пути и альтернативного пути не детектировалась.

Результат, представленный на фиг. 35В и 35С, также подтвердил понимание авторами роли MASP-1 и MASP-3 в путях LEA-1 и LEA-2. В частности, отсутствие альтернативного пути и, при этом, почти полностью функциональный лектиновый путь в сыворотке пациента 2, у которого отсутствовал только MASP-3, подтвердили, что MASP-3 играет важную роль в активации альтернативного пути. Сыворотка

пациента 3, не содержащая MASP-1 и MASP-3, теряла свою способность активировать лектиновый путь, а также альтернативный путь. Этот анализ подтвердил обязательное участие MASP-1 в функциональном пути LEA-2 и соответствовал результатам примера 7 и данным, имеющимся в литературе, которые указывают на то, что MASP-1 активирует MASP-2. Эта кажущаяся неспособность сывороток активировать про-фактор D также соответствует данным, описанным в примере 9, где продемонстрировано, что MASP-3 расщепляет про-фактор D. Эти наблюдения соответствуют наблюдениям путей LEA-1 и LEA-2, представленных на диаграмме на фиг. 1.

Эксперимент #4. Анализ на гемолиз покрытых маннаном кроличьих эритроцитов, оцененных на лизис в присутствии человеческой нормальной сыворотки или ЗМС-сыворотки (в отсутствии Ca^{++}).

Методы.

Получение кроличьих эритроцитов в отсутствии Ca^{++} (т.е. с использованием EGTA).

Цельную кроличью кровь (2 мл) распределяли по двум 1,5-мл пробиркам Эппендорфа и центрифугировали в течение 3 мин при 8000 об/мин (приблизительно 5,9 RCF) в рефрижераторной центрифуге при 4°C. Осадок эритроцитов три раза промывали после ресуспендирования в охлажденном льдом BBS/ $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$ (4,4 мМ барбитуровой кислоты, 1,8 мМ натрий-содержащего барбитона, 145 мМ NaCl, pH 7,4, 5 мМ Mg^{++} , 5 мМ Ca^{++}). После третьей промывки, осадок ресуспендировали в 4 мл BBS/ $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$. Эритроциты осаждали и промывали BBS/0,1% желатина/ $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$, как описано выше. Суспензию эритроцитов хранили в BBS/0,1% желатине/ $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$ при 4°C. Затем 100 мкл суспендированных эритроцитов разводили 1,4 мл воды и центрифугировали при 8000 об/мин (приблизительно 5,9 RCF) в течение 3 мин и ОП супернатанта доводили до 0,7 на 541 нм (ОП, равная 0,7 на 541 нм, соответствует приблизительно 10^9 эритроцитов/мл). После этого 1 мл ресуспендированных эритроцитов при ОП 0,7 добавляли к 9 мл BBS/ $\text{Mg}^{++}/\text{EGTA}$ до концентрации 10^8 эритроцитов/мл. Разведения тестируемой сыворотки или плазмы приготавливали в охлажденном льдом BBS, Mg^{++} , EGTA, и 100 мкл каждого разведения сыворотки или плазмы пипетировали в соответствующую лунку круглодонного планшета. 100 мкл соответствующим образом разведенных эритроцитов (10^8 эритроцитов/мл) добавляли в каждую лунку. Нано-воду использовали для получения позитивного контроля (100% лизис), а в качестве негативного контроля использовали разведение BBS/ $\text{Mg}^{++}/\text{EGTA}$ без сыворотки или плазмы. Затем планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Круглодонный планшет центрифугировали при 3750 оборотов в минуту в течение 5 мин. После этого супернатант из каждой лунки переносили в соответствующие лунки плоскодонного планшета и ОП считывали на 415-490 нм.

Результаты. На фиг. 36 графически проиллюстрирован процент гемолиза (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов в концентрациях в сыворотке, взятой у здоровых индивидуумов и у двух ЗМС-пациентов (пациента 2 и пациента 3) в отсутствии Ca^{++} . Как показано на фиг. 36, было продемонстрировано, что дефицит MASP-3 приводит к снижению процента комплемент-опосредуемого лизиса покрытых маннаном эритроцитов по сравнению с нормальной человеческой сывороткой. Различия между двумя кривыми, построенными по данным для нормальной человеческой сыворотки, и двумя кривыми, построенными по данным для ЗМС-пациента, являются значимыми ($p=0,013$, критерий Фридмана).

Ниже в табл. 16 систематизированы результаты AP_{50} , представленные на фиг. 36.

Таблица 16. Краткое изложение результатов, представленных на фиг. 36

Тип сыворотки	AP_{50} (%)
Нормальная человеческая сыворотка #1	7,1
Нормальная человеческая сыворотка #2	8,6
ЗМС-пациент #2	11,9
ЗМС-пациент #3	14,3

Примечательно то, что при объединении проб сыворотки, представленных в табл. 16, величина AP_{50} для нормальной человеческой сыворотки равна 7,9, а величина AP_{50} для ЗМС-сыворотки равна 12,8 ($p=0,031$, ранговый критерий значимости парных совпадений Уилкоксона).

Эксперимент #5. Восстановление человеческой ЗМС-сыворотки под действием рекомбинантного MASP-3 способствует сохранению АП-индуцированного осадения C3b на планшетах, покрытых зимозаном.

Методы.

Анализ АП осуществляли в традиционных АП-специфических условиях (BBS/ $\text{Mg}^{++}/\text{EGTA}$, без Ca^{++} , где BBS=забуференный барбиталом физиологический раствор, содержащий сахарозу), как описано Vitter-Suermann et al., Eur. J. Immunol. 11:291-295 (1981)) на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в следующих пробах сыворотки: (1) в 5% человеческой сыворотке, взятой у ЗМС-пациента #2, с полноразмерным активным гMASP-3, добавленным в количестве от 0 до 20 мкг/мл; (2) в 10% человеческой сыворотке, взятой у ЗМС-пациента #2, с полноразмерным активным гMASP-3, добавленным в количестве от 0 до 20 мкг/мл; и (3) в 5% человеческой сыворотке, взятой у ЗМС-пациента #2, с неактив-

ным rMASP-3A (S679A), добавленным в количестве от 0 до 20 мкг/мл.

Результаты.

На фиг. 37 графически проиллюстрирован уровень АП-индуцированного осаждения C3b на покрытых зимозаном микротитрационных планшетах в зависимости от концентрации белка rMASP-3, добавленного в пробу сыворотки, взятой у ЗМС-пациента #2 (MASP-3-дефицитного). Как показано на фиг. 37, активный рекомбинантный белок MASP-3 восстанавливает АП-индуцированное осаждение C3b на покрытых зимозаном планшетах в зависимости от концентрации. Как дополнительно показано на фиг. 37, в ЗМС-сыворотке, содержащей неактивный rMASP-3 (S679A), осаждения C3b не наблюдалось.

Эксперимент #6. Восстановление человеческой ЗМС-сыворотки под действием рекомбинантного MASP-3 способствует сохранению гемолитической активности в сыворотке ЗМС-пациента.

Методы.

Гемолитический анализ проводили с использованием кроличьих эритроцитов методами, описанными выше в Эксперименте #2, в следующих тестируемых сыворотках в концентрации от 0 до 12%: (1) в нормальной человеческой сыворотке; (2) в сыворотке ЗМС-пациента; (3) в сыворотке ЗМС-пациента плюс активный полноразмерный rMASP-3 (20 мкг/мл); и (4) в термоинактивированной человеческой сыворотке.

Результаты.

На фиг. 38 графически проиллюстрирован процент гемолиза (измеренный по высвобождению гемоглобина лизированными кроличьими эритроцитами в супернатант посредством фотометрии) покрытых маннаном кроличьих эритроцитов в определенных концентрациях сыворотки: (1) нормальной человеческой сыворотки; (2) сыворотки ЗМС-пациента; (3) сыворотки ЗМС-пациента, содержащей активный полноразмерный rMASP-3 (20 мкг/мл); и (4) термоинактивированной человеческой сыворотки в отсутствие Ca^{++} . Как показано на фиг. 38, процент лизиса кроличьих эритроцитов значительно увеличивается в ЗМС-сыворотке, содержащей rMASP-3 по сравнению с процентом лизиса в ЗМС-сыворотке, не содержащей rMASP-3 ($p=0,0006$).

На фиг. 39 графически проиллюстрирован процент лизиса кроличьих эритроцитов в 7% человеческой сыворотке, взятой у ЗМС-пациента 2 и ЗМС-пациента 3 и содержащей активный rMASP-3 в концентрации от 0 до 110 мкг/мл в BBS/ Mg^{++} /EGTA. Как показано на фиг. 39, процент лизиса кроличьих эритроцитов сохраняется, если активность rMASP-3 в зависимости от концентрации составляет 100%.

Эксперимент #7. Сыворотка MASP-3-дефицитного (ЗМС) пациента имеет функциональный MASP-2, если присутствует MBL.

Методы.

Анализ на осаждение C3b проводили на покрытых маннаном ELISA-планшетах для того, чтобы определить, является ли ЗМС-сыворотка дефицитной по LEA-2. Цитрат-содержащую плазму разводили в буфере BBS в несколько разведений (1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) и высевали на покрытые маннаном планшеты. Осажденный C3b детектировали в анализе с использованием куриного антитела против человеческого C3b. LEA-2-индуцированное осаждение C3b (разведения плазмы увеличивали для инициации функционирования АП и LEA-1) на покрытых маннаном ELISA-планшетах оценивали в зависимости от концентрации человеческой сыворотки, взятой у здорового человека (NHS), у двух ЗМС-пациентов (пациента 2 и пациента 3), у родителей пациента 3 и у MBL-дефицитного индивидуума.

Результаты.

На фиг. 40 графически проиллюстрирован уровень LEA-2-индуцированного (т.е. MASP-2-индуцированного) осаждения C3b на покрытых маннаном ELISA-планшетах в зависимости от концентрации человеческой сыворотки, разведенной в буфере BBS и взятой у здорового человека (NHS); у двух ЗМС-пациентов (пациента 2 и пациента 3); у родителей пациента 3 и у индивидуума с дефицитом MBL. Эти данные показали, что у пациента 2, уровень MBL является достаточным. Однако у пациента 3 и у матери пациента 3 наблюдается дефицит MBL, а поэтому их сыворотка не осаждает C3b на маннаны посредством LEA-2. Замена MBL в этих сыворотках приводит к восстановлению LEA-2-опосредованного осаждения C3b в сыворотке пациента 3 (который является гомозиготным по SNP, что приводит к дефициту MASP-3) и его матери (которая является гомозиготной по мутантному аллелю MASP-3) (данные не приводятся). Эти результаты показали, что ЗМС-сыворотка не является дефицитной по LEA-2, но имеет функциональный MASP-2.

Общие выводы и заключения.

Эти результаты продемонстрировали, что дефицит MASP-3 в человеческой сыворотке приводит к потере активности АП, на что указывает снижение уровня осаждения C3b на покрытых зимозаном лунках и снижение уровня лизиса кроличьих эритроцитов. АП может быть восстановлен в обоих анализах путем добавления сыворотки, содержащей функциональный рекомбинантный человеческий MASP-3.

Пример 11.

В этом примере продемонстрировано, что моноклональное антитело против человеческого MASP-3, содержащее химерную мышиную V-область/человеческую константную область IgG4 (mAb M3-1, также обозначаемое mAb 13B1), представляет собой сильный ингибитор MASP-3-опосредуемой активации комплемента альтернативного пути (APC).

Методы.

Получение моноклонального антитела против человеческого MASP-3, содержащего химерную мышиную V-область/человеческую константную область IgG4 (mAb M3-1).

Мышиное ингибирующее антитело против человеческого MASP-3 (mAb M3-1) получали путем иммунизации мышей с MASP-1/3-нокаутом человеческим доменом MASP-3 CCP1-CCP2-SP (а.к. 301-728 SEQ ID NO: 2) (см. также пример 14). Вкратце, спленоциты иммунизированных мышей подвергали слиянию с P3/NS1/1-Ag4-1, и супернатанты полученных гибридомных клонов скринировали на продуцирование антител, которые связываются с человеческим MASP-3, и на их способность блокировать MASP-3-опосредованное расщепление про-фактора D (про-CFD) комплемента с образованием фактора D (CFD). Вариабельные области моноклонального антитела (mAb) выделяли с помощью ОТ-ПЦР, секвенировали и клонировали в человеческие экспрессионные векторы IgG4. Химерные моноклональные антитела экспрессировали в транзигентно трансфицированных клетках HEK293T, очищали и тестировали на аффинность связывания с мышинным и человеческим MASP-3 и на способность ингибировать MASP-3-опосредованное расщепление про-CFD с образованием CFD.

MASP-3-ингибирующее моноклональное антитело M3-1 (13B1) содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную как SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи (VL), представленную как SEQ ID NO: 45. Последовательности вариабельных областей моноклонального антитела M3-1 представлены ниже.

Вариабельная область тяжелой цепи.

Ниже представлена последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) для mAb M3-1. CDR по Кэбату (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) подчеркнуты и соответствуют аминокислотным остаткам 31-35 (H1), 50-66 (H2) и 99-102 (H3) SEQ ID NO: 30.

Вариабельная область тяжелой цепи mAb M3-1 (VH) (SEQ ID NO: 30)

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIGIEILPGTGSTNYNEK
FKG KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSEDVWGTGTTVTVSS

Вариабельная область легкой цепи.

Ниже представлена последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) для mAb M3-1. CDR по Кэбату (24-34 (H1), 50-56 (H2) и 89-97 (H3) подчеркнуты и соответствуют аминокислотным остаткам 24-40 (L1); 56-62 (L2) и 95-102 (L3) SEQ ID NO: 45. Эти области являются одинаковыми независимо от того, пронумерованы ли они по системе Кэбата или Чотия.

Вариабельная область легкой цепи (VL) mAb M3-1 (SEQ ID NO: 45)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP
DRFTGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPTFGGGTKLEIKR

mAb M3-1 VH CDR

VHCDR1: GKWIE (SEQ ID NO: 84)

VHCDR2: EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 86)

VHCDR3: SEDV (SEQ ID NO: 88)

mAb M3-1 VL CDR

VLCDR1: KSSQSLLSRTRKKNYLA (SEQ ID NO: 142)

VLCDR2: WASTRES (SEQ ID NO: 144)

VLCDR3: KQSYNIPT (SEQ ID NO: 161)

Как показано выше, моноклональное анти-MASP-3 антитело M3-1 содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) VHCDR1, включающую SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, включающую SEQ ID NO: 86, и (iii) VHCDR3, включающую SEQ ID NO: 88; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) VLCDR1, включающую SEQ ID NO: 142, (ii) VLCDR2, включающую SEQ ID NO: 144, и (iii) VLCDR3, включающую SEQ ID NO: 161.

Связывание mAb M3-1 с рекомбинантными формами человеческого и мышинного MASP-3.

Одновалентный вариант Fab M3-1 тестировали на связывание с рекомбинантным полноразмерным человеческим и мышинным белком MASP-3 в ELISA-эксперименте. Определение аффинности связывания осуществляли путем покрытия 96-луночных планшетов анти-MASP-3 антителом для захвата, которое связывается с белком, происходящим от множества видов. Было показано, что антитело для захвата связывается с областью CCP1-CCP2 MASP-1 и MASP-3. Полноразмерные варианты человеческого и мышинного белка иммобилизовали на ELISA-планшетах, покрытых антителом для захвата, и Fab M3-1 в различных концентрациях связывались с белком-мишенью в отдельных лунках. Связанный M3-1 детектировали с использованием легкой цепи антитела против каппа-цепи, которое было конъюгировано с ПХ (Novus Biologicals NBP1-75064), и визуализировали с использованием набора реагентов, которые являются субстратами для TMB (BD Biosciences 555214).

На фиг. 41 графически проиллюстрирован репрезентативный пример эксперимента по связыванию, который был проведен с использованием человеческого MASP-3, где Fab M3-1 (также обозначаемый 13B1) связывался с человеческим белком с кажущейся аффинностью связывания (EC_{50}) приблизительно 0,117 нМ.

На фиг. 42 графически проиллюстрирован репрезентативный пример эксперимента по связыванию,

который был проведен с использованием мышиного MASP-3, где Fab M3-1 связывался с мышинным белком с кажущейся аффинностью связывания (EC_{50}) приблизительно 0,214 нМ.

Эти результаты продемонстрировали, что mAb M3-1 (13B1) имеет высокую аффинность связывания с человеческим и мышинным MASP-3.

Определение способности mAb M3-1 ингибировать активацию комплемента альтернативного пути (APC) и измерение *in vitro* активности mAb M3-1.

Как описано в настоящей заявке, было определено, что MASP-3 является ключевым регулятором APC, что, по меньшей мере, частично обусловлено тем, что он необходим для активации CFD, т.е. центрального фермента APC. Кроме того, как описано в настоящей заявке, MASP-3 циркулирует в организме в относительно низкой концентрации и имеет низкую скорость катаболизма, что позволяет осуществлять длительное ингибирование провоспалительного пути после внутривенного, подкожного и перорального введения анти-MASP-3 антитела. Нижеследующий эксперимент проводили для определения эффективности mAb M3-1 в ингибировании MASP-3-опосредованного созревания CFD и ингибирования APC в человеческой сыворотке. Нормальная человеческая сыворотка содержит преимущественно активный или процессированный (т.е. зрелый) CFD, а поэтому авторами были проведены эксперименты, в которых CFD-дефицитную человеческую сыворотку (Complement Technology A336) разводили рекомбинантной непротессированной формой CFD (про-CFD). Таким образом, в этой экспериментальной системе, для активации APC требуется процессинг про-CFD в активный CFD.

APC индуцировали путем добавления частиц зимозана, которые функционируют как активирующая поверхность для осаждения комплемента. К сыворотке, перед добавлением рекомбинантного про-CFD и зимозана, добавляли mAb M3-1 в различных концентрациях. Смеси инкубировали при 37°C в течение 75 мин и активность APC измеряли путем детектирования фактора Bb комплемента (Quidel A252) на поверхности частиц зимозана с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 43 графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Bb комплемента на частицах зимозана (определенный посредством проточного цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций mAb M3-1 в CFD-дефицитной человеческой сыворотке. Как показано на фиг. 43, mAb M3-1 обнаруживает способность к сильному ингибированию APC в 10% человеческой сыворотке, где IC_{50} составляет 0,311 нМ в этом экспериментальном примере.

Эти результаты продемонстрировали, что MASP-3 играет ключевую роль в *in vitro* активации APC в модели человеческой сыворотки, и кроме того, показали, что mAb M3-1 является сильным ингибитором APC.

Ингибирование APC антителом mAb M3-1 *in vivo*.

Для определения эффективности mAb M3-1 в ингибировании APC *in vivo*, группе мышей (n=4) вводили в хвостовую вену одну внутривенную инъекцию 10 мг/кг mAb M3-1. Кровь, взятую у животных, использовали для получения сыворотки и для создания матрицы для оценки активности APC с помощью проточной цитометрии в анализе *ex vivo*, который позволяет определять уровень осаждения C3 (также C3b и iC3b) на частицах зимозана. Сыворотку, полученную из крови, взятой до введения дозы и через некоторое время после введения дозы (через 96 ч, 1 и 2 недели), разводили до 7,5% и добавляли частицы зимозана для индуцирования APC. Мышей, обработанных антителом, сравнивали с группой контрольных мышей (n=4), которым вводили одну внутривенную дозу носителя.

На фиг. 44 графически проиллюстрирован уровень осаждения C3 на частицах зимозана в различные периоды времени после введения одной дозы mAb M3-1 (10 мг/кг *i.v.*) мышам дикого типа. Как показано на фиг. 44, в условиях введения предварительной дозы, уровни активности APC были сравнимыми. Через 96 ч и через два последующие промежутка времени, у группы, обработанной mAb M3-1, наблюдалось почти полное ингибирование APC, а активность APC у группы, обработанной носителем, оставалась на том же уровне. Как показано на фиг. 44, одна доза mAb M3-1, вводимая мышам внутривенно, приводила к почти полной элиминации системной активности APC по меньшей мере через 14 дней.

Эти результаты продемонстрировали, что mAb M3-1 является сильным ингибитором APC *in vivo* у мышинной модели.

Пример 12.

В этом примере продемонстрировано, что моноклональное антитело против человеческого MASP-3, содержащее химерную мышиную V-область/человеческую константную область IgG4 (mAb M3-1, также обозначаемое mAb 13B1), дает явное преимущество с точки зрения выживаемости эритроцитов, не содержащих Cту, у мышей с моделью пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).

Методы.

Моноклональное антитело против человеческого MASP-3, содержащее химерную мышиную V-область/человеческую константную область IgG4 (mAb M3-1), получали, как описано в примере 11 и в примере 14. Кроме того, как описано в примере 11, было определено, что mAb M3-1 является сильным ингибитором APC у мышинной модели *in vivo*. В этом примере описан анализ mAb M3-1 на его эффективность у мышинной модели, ассоциированной с ПНГ.

Анализ mAb M3-1 на его эффективность у мышинной модели, ассоциированной с ПНГ.

У мышинной модели с ПНГ эритроциты (RBC) Cту-дефицитных мышей, не содержащих основного

репрессора APC клеточной поверхности, получали для их использования в качестве донорных клеток. Параллельно приготавливали эритроциты, взятые у мышей-доноров дикого типа (WT). Эти донорные эритроциты отдельно метили флуоресцентными липофильными красителями (Sigma): WT (красным) и Cту-мышей (зеленым). В двух различных экспериментах меченные донорные клетки WT и Cту-клетки смешивали 1:1 и внутривенно инъецировали мышам-реципиентам дикого типа, а затем процент жизнеспособности эритроцитов WT и Cту-дефицитных эритроцитов (по сравнению с жизнеспособностью в ранний период времени) у мышей-реципиентов определяли путем анализа 20000 живых клеток с помощью проточной цитометрии. В первом эксперименте проводили множество обработок путем введения предварительной дозы антитела mAb M3-1 и эффект mAb M3-1 сравнивали в эффекте другого комплемент-ингибирующего антитела mAb BB5.1 (поставляемого Nycult Biotech), которое представляет собой C5-ингибирующее антитело, обладающее эффективностью во многих исследованиях на мышах (Wang et al., PNAS vol 92:8955-8959, 1995; Hugen et al., Kidney Int. 71(7):646-54, 2007). Введение ингибитора C5 представляет собой стандартный современный курс лечения пациента, страдающего ПНГ. Во втором эксперименте оценивали одну предварительную дозу mAb M3-1.

В первом эксперименте оценивали три различных группы мышей (n=4) для каждого состояния: состояния при обработке носителем, состояния при обработке mAb M3-1 и состояния при обработке mAb BB5.1 (mAb, блокирующим мышиный C5). Меченные клетки инъецировали мышам на "день 0", а множество доз M3-1 и BB5.1 вводили следующим образом: mAb M3-1 вводили внутривенно (10 мг/кг) на дни -11, -4, -1 и +6. mAb BB5.1 вводили путем внутрибрюшинной инъекции (40 мг/кг) на дни -1, +3, +6 и +10. Обработку носителем осуществляли по схеме введения доз, проводимой для mAb M3-1.

На фиг. 45 графически проиллюстрирован процент выживших донорных RBC (дикого типа или Cту-) в течение 14 дней у мышей-реципиентов дикого типа, обработанных mAb M3-1 (13B1) (10 мг/кг на дни -11, 04, -1 и +6), у мышей, обработанных mAb BB5.1 или у мышей, обработанных носителем. Как показано на фиг. 45, в отличие от эритроцитов дикого типа, жизнеспособность которых была типичной для мышей, обработанных носителем, Cту-дефицитные эритроциты подвергались быстрому клиренсу (более, чем на 75% за 24 ч). Обработка мышей mAb BB5.1 не давала улучшения с точки зрения жизнеспособности Cту-дефицитных эритроцитов по сравнению с обработкой носителем. В противоположность этому, обработка животных антителом mAb M3-1 приводила к резкому повышению жизнеспособности Cту-дефицитных эритроцитов по сравнению с обработкой mAb BB5.1 и носителем. Протективный эффект mAb M3-1 наблюдался в течение всего эксперимента.

Во втором исследовании отдельно меченные эритроциты WT (красным) и Cту (зеленым) оценивали у двух различных групп мышей дикого типа (n=4 на состояние): мышей, обработанных носителем, и мышей, обработанных антителом mAb M3-1. Одну дозу носителя или антитела (20 мг/кг) вводили мышам-реципиентам путем внутривенного введения в течение шести дней (день -6), а затем мышам-реципиентам вводили меченные донорные клетки. После этого меченные донорные эритроциты анализировали на процент жизнеспособности у мышей-реципиентов через определенные промежутки времени после инъекции в течение 16 дней.

На фиг. 46 графически проиллюстрирован процент выживших донорных RBC (дикого типа или Cту-) в течение 16 дней у мышей-реципиентов дикого типа, обработанных одной дозой mAb M3-1 (13B1) (20 мг/кг на день -6), или мышей, обработанных носителем. Как показано на фиг. 46, одна предварительная обработка дозой mAb M3-1 приводила к повышению жизнеспособности Cту-RBC по сравнению с жизнеспособностью Cту-RBC у мышей, обработанных носителем. Через 96 ч после инъекции приблизительно 90% эритроцитов дикого типа, обработанных носителем, выживали в контрольных условиях, тогда как у мышей дикого типа, обработанных носителем, выживало только 5% Cту-RBC. В отличие от мышей, обработанных носителем, у мышей, обработанных mAb M3-1, выживало 40% Cту-RBC.

В целом, эти результаты показали, что MASP-3-ингибирующее антитело mAb M3-1 дает явное преимущество с точки зрения жизнеспособности эритроцитов, не содержащих Cту, поскольку это антитело является ключевым ингибитором комплемента на клеточной поверхности у мышей с моделью ПНГ.

Пример 13.

В этом примере описано исследование, которое продемонстрировало, что химерное моноклональное MASP-3-ингибирующее антитело (mAb M3-1, также обозначаемое mAb 13B1) приводит к снижению клинических оценок артрита, индуцированного антителом против коллагена (CAIA), у мышей с моделью ревматоидного артрита (РА).

Предпосылки/Обоснование.

CAIA представляет собой хорошо разработанную модель артрита у животного. В дополнение к информации о РА было установлено, что патология заболевания у модели с CAIA связана с APC. Banda и сотрудники продемонстрировали улучшение результатов лечения на модели CAIA у мышей с дефицитом компонентов APC, таких как фактор В и фактор D (Banda et al., J. Immunol. vol 177:1904-1912, 2006 и Banda et al., Clinical & Exp. Immunol. Vol. 159:100-108, 2009). У мышей с APC-нокаутом наблюдались более низкие оценки для артрита (заболевания), уменьшение случаев заболеваемости и меньший уровень осадения СЗ и фактора Н в синовиальной ткани и в окружающих тканях по сравнению с контролем ди-

кого типа. Кроме того, оценки тяжести заболевания, отложения C3 комплемента в ткани суставов и гистопатологических повреждений были значительно снижены у мышей с MASP1/3-нокаутом (Banda et al., J. Immunol. Vol. 185:5598-5606, 2010). Поэтому MASP-3-ингибирующее антитело mAb M3-1 было проанализировано на эффективность у модели CAIA.

Методы.

Химерное моноклональное анти-MASP-3 антитело (mAb M3-1) получали как описано в примере 11 и в примере 14. Кроме того, как описано в примере 11, было определено, что mAb M3-1 является сильным ингибитором APC у мышинной модели *in vivo*.

mAb M3-1 было протестировано у модели CAIA следующим образом. Мышам дикого типа (n=7) внутривенно инъектировали 3 мг смеси антител против коллагена на день 0. Мышам внутривенно вводили дозу липополисахарида *E.coli* (ЛПС) (25 мкг/мышь) на день +3. Как описано у Nandakumar и др. (Am. J. Pathol. 163(5):1827-1837, 2003), артрит у этой модели обычно появляется на дни от +3 до +10. Последние пробы сыворотки брали на день +14. После этого вводили дозу mAb M3-1 (5 и 20 мг/кг) на дни -12, -5, +1 и +7. Носитель (PBS) инъектировали в качестве негативного контроля.

Клинические оценки давали для всех четырех лап каждой мыши в исследованиях на дни 0-14 в соответствии с нижеследующими стандартными оценками:

- 0 - норма;
- 1 - поражение сустава 1 задней и/или передней лапы или минимальная диффузная эритема и распухание;
- 2 - поражение суставов 2 задних и/или передних лап или слабая диффузная эритема и распухание;
- 3 - поражение суставов 3 задних и/или передних лап или диффузная эритема средней тяжести и распухание;
- 4 - заметная диффузная эритема и распухание или поражение суставов 4 пальцев;
- 5 - тяжелая диффузная эритема и сильное распухание всех лап, и неспособность сгибать пальцы.

Заболеваемость была также определена как % мышей в группе обработки, у которых наблюдались симптомы артрита.

Результаты представлены на фиг. 47 (клинические оценки) и на фиг. 48 (заболеваемость артритом). На фиг. 47 графически проиллюстрированы клинические оценки для мышей, обработанных mAb M3-1 (13B1) (5 или 20 мг/кг) или мышей, обработанных носителем в течение 14 дней. На фиг. 48 графически проиллюстрирован процент заболеваемости артритом у мышей, обработанных mAb M3-1 (13B1) (5 или 20 мг/кг), или у мышей, обработанных носителем в течение 14 дней. Как показано на фиг. 47, mAb M3-1 продемонстрировало явный терапевтический эффект для обеих конечных точек, начиная со дня 5 и вплоть до конца исследования. Как показано на фиг. 48, хотя у животных, обработанных носителем, заболеваемость достигала 100%, однако, у двух третей животных, которым вводили 5 мг/кг mAb M3-1, заболевания не наблюдалось. Кроме того, только у одного животного (т.е. только у одного из всех животных, n=7) наблюдались какие-либо симптомы артрита после введения 20 мг/кг mAb M3-1.

Результаты этого исследования продемонстрировали, что MASP-3-ингибирующее антитело mAb M3-1 дает явный терапевтический эффект у модели CAIA, т.е. хорошо разработанной мышинной модели ревматоидного артрита (РА) и модели, тесно ассоциированной с активацией APC. Как показано в примере 11, одна доза mAb M3-1, вводимая мышам внутривенно, приводила к почти полной элиминации системной активности APC по меньшей мере через 14 дней. Как указано в этом примере, у животных с моделью, индуцированной путем введения аутоантител против мышинной соединительной ткани, mAb M3-1 снижало заболеваемость и тяжесть артрита в соответствии с клиническими оценками в зависимости от дозы. По сравнению с контрольными животными, у животных, которым вводили mAb M3-1, наблюдалось снижение заболеваемости и тяжести заболевания приблизительно на 80% при наивысшей тестируемой дозе. Следовательно, как и предполагалось, введение MASP-3-ингибирующего антитела, такого как mAb M3-1, будет давать терапевтический эффект у пациентов, страдающих артритом, таким как ревматоидный артрит, остеоартрит, ювенильный ревматоидный артрит, артрит, вызываемый инфекцией, псориатический артрит, а также анкилозирующий спондилит и болезнь Бехчета.

Пример 14.

В этом примере описано получение высокоаффинных ингибирующих антител против человеческого MASP-3.

Предпосылки/Обоснование.

Было описано ограниченное число антител, специфичных к MASP-3 (Thiel et al., Mol. Immunol. 43:122, 2006; Moller-Kristensen et al., Int. Immunol. 19:141, 2006; Skjoedt et al., Immunobiol 215:921, 2010). Эти антитела могут быть использованы в анализах по детектированию, таких как вестерн-блот-анализ, иммунопреципитация и ELISA-анализы с использованием реагентов для захвата или детектирующих реагентов. Однако было обнаружено, что антитела, описанные Thiel et al., 2006, Moller-Kristensen et al., 2006 и Skjoedt et al., 2010, не ингибируют каталитическую активность MASP-3.

Антитела против MASP-3 были также получены ранее, как описано здесь в примере 7 (а также в примере 15 опубликованной заявки WO 2013/192240), путем скрининга библиотеки куриных антител в

модифицированной клеточной линии DT40, DTLacO, для MASP-3-связывающих антител. Эти антитела связывались с человеческим MASP-3 в наномолярном диапазоне при EC_{50} от 10 до 100 нМ и частично ингибировали расщепление про-CFD под действием MASP-3.

В этом примере описано получение ингибирующих антител против человеческого MASP-3 с необычно высокой аффинностью связывания (т.е. субнаномолярной аффинностью связывания в пределах от ≤ 500 до 20 пМ). Антитела, описанные в этом примере, специфически связываются с человеческий MASP-3 с высокой аффинностью (например, ≤ 500 пМ), ингибируют созревание фактора D и не связываются с человеческим MASP-1 (SEQ ID NO: 8).

Методы.

1. Получение моноклонального антитела против человеческого MASP-3, содержащего химерную мышиную V-область/человеческую константную область IgG4.

7-14-недельных мышей C57BL/6 с MASP-1/3-нокаутом иммунизировали человеческим полипептидом MASP-3 CCP1/CCP2/SP (аминокислотные остатки 299-728 SEQ ID NO: 2), включающим эпитопную метку StrepTag II на N-конце; или человеческим доменом SP MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2), включающим StrepTagII на N-конце, с использованием системы адъювантов Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Мышам внутрибрюшинно инъектировали 50 мкг иммуногена на мыш. Иммунизованным мышам через 14 дней вводили бустер-дозу дополнительного иммуногена в адъюванте. Затем мышам в течение нескольких недель вводили бустер-дозу иммуногена в PBS через каждые 14-21 день. Пробы сыворотки периодически брали из хвостовой крови и тестировали с помощью ELISA на присутствие антиген-специфических антител. Мышам с высоким титром антител вводили бустер-дозу иммуногена в PBS за четыре дня до слияния со спленоцитами. За три дня до слияния мышам подкожно вводили в основание хвоста 50 мкг агониста анти-CD40 mAb в PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) для увеличения числа В-клеток (см. Rucyzy et al., Hybridoma 27:25-30, 2008). Затем мышей умерщвляли, после чего собирали клетки селезенки и подвергали слиянию с отобранной мышинной миеломной клеточной линией P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC № TIB18) с использованием 50% полиэтиленгликоля или 50% полиэтиленгликоля плюс 10% ДМСО. Это слияние приводило к образованию гибридных клеток, которые культивировали в 96-луночных планшетах для культивирования ткани, содержащих среду НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), для ингибирования пролиферации неслитых клеток, миеломных гибридов и гибридов клеток селезенки. После отбора гибридом супернатанты культуры анализировали на связывание с MASP-3 (ELISA) и ингибирование активации про-фактора D. Позитивные гибридомы идентифицировали и субклонировали методами серийного разведения.

Таблица 17. Краткое описание экспериментов по слиянию

Слияние	Иммуноген: Человеческий MASP-3	Все гибридомы	MASP-3- связывающиеся гибридомы	Функциональные MASP-3- гибридомы
1	SP	434	38	10
2	SP	279	13	0
3	CCP1/CCP2/SP	348	40	2
4	CCP1/CCP2/SP	319	60	2
5	CCP1/CCP2/SP	651	152	1
6	CCP1/CCP2/SP	1297	ND	1

Примечание: "ND" означает, что такое слияние скринировали только на функциональное ингибирование активации про-CFD.

Результаты.

Как показано в табл. 17, было скринировано всего 3328 гибридом от индуцированных MASP-1/3-НК-мышей, из которых, как было обнаружено, >303 связываются с MASP-3, а 16 связываются с MASP-3 и ингибируют активацию про-CFD. mAb M3-1 (13B1), описанное в примере 11, представляет собой одно из 16 функциональных MASP-3-ингибирующих антител, описанных в табл. 17. Как описано в примере 15, было определено, что все 16 функциональных MASP-3-ингибирующих антител связываются с человеческим MASP-3 с необычно высокой аффинностью связывания (≤ 500 пМ).

Обсуждение.

В этом примере описано получение антител, которые ингибируют человеческий MASP-3 с необычно высокой аффинностью связывания (т.е. с субнаномолярной аффинностью связывания в пределах от ≤ 500 до 20 пМ), путем иммунизации мышей с MASP-1/3-нокаутом. Антитела, описанные в этом примере, специфически связываются с человеческий MASP-3 с высокой аффинностью (например, ≤ 500 пМ), ингибируют созревание фактора D и не связываются с человеческим MASP-1. Как описано в настоящей заявке, аминокислотные последовательности человеческого, мышинного и куриного MASP-3 показали, что домен SP MASP-3 является в высокой степени консервативным, а особенно в активном сайте (см. фиг. 4 и 5). Вероятно, что способность к продуцированию MASP-3-ингибирующих антител с необычно

высокой аффинностью связывания у MASP-1/3-НК-мышей, как описано в этом примере, частично обусловлена отсутствием иммунологической толерантности, которая может препятствовать образованию в высокой степени активных антител, специфичных к каталитическому сайту MASP-3, у животных дикого типа.

Пример 15.

В этом примере описан анализ по клонированию и секвенированию высокоаффинных ингибирующих mAb против человеческого MASP-3.

Методы.

Клонирование и очистка рекомбинантных антител.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи клонировали из гибридом, описанных в примерах 11 и 14, с помощью ОТ-ПЦР, и секвенировали. Химерные mAb "мышь-человек", состоящие из вариабельных областей мышинового mAb, присоединенных к константным областям тяжелой цепи человеческого IgG4 (SEQ ID NO: 311) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 313), получали в виде рекомбинантных белков в клетках Expi2 93F. Константная шарнирная область IgG4 (SEQ ID NO: 311) содержит стабилизирующую аминокислотную замену S228P. В одном из вариантов осуществления изобретения химерные mAb присоединяли к константной шарнирной области человеческого IgG4 (SEQ ID NO: 312), которая содержит аминокислотную замену S228P, а также мутацию, которая стимулирует взаимодействия с FcRn при низком pH.

Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи представлены на фиг. 49А и 49В, соответственно ("SIN"="SEQ ID NO:" на фиг. 49А и 49В), и описаны ниже. Гипервариабельные области (CDR) и каркасные области (FR) каждого из этих антител представлены ниже в табл. 18-22.

На фиг. 50А представлена дендрограмма VH-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3 и продуцированных у MASP-1/3-НК-мышей. На фиг. 50В представлена дендрограмма VL-областей высокоаффинных mAb, ингибирующих человеческий MASP-3 и продуцированных у MASP-1/3-НК-мышей. Как показано на фиг. 50А и 50В, было идентифицировано несколько групп родственных антител.

Ниже представлены последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) для каждого высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела. CDR, пронумерованные по Кэбату, подчеркнуты.

Вариабельные области тяжелой цепи.

4D5_VH: SEQ ID NO:24

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTTDDINWVKQRPQGQLEWIGWIIYPRDDRTK
YNDKFKDKATLTVDTSSTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSSLEDTYWGQGTTLVAVSS

1F3_VH: SEQ ID NO:25

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPQGQLEWIGWIIYPRDGSIK
YNEKFTDKATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSGVEDSYWGQGTTLTVSS

4B6_VH: SEQ ID NO:26

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPQGQLEWIGWIIYPRDGTTK
YNEEFTDKATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSSVEDSYWGQGTTLTVSS

1A10_VH: SEQ ID NO:27

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPQGQLEWIGWIIYPRDGTTK
YNEKFTDKATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSSVEDSYWGQGTTLTVSS

10D12_VH: SEQ ID NO:28

QIQLVQSGPELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPT
YADDFKGRFAFSLETSARTPYLQINNKNEDTATYFCARGGEAMDYWGQGTSTTVSS

35C1_VH: SEQ ID NO:29

QIQLVQSGPELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYGITWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPT
YADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTTTYFCTRGGDALDYWGQGTSTTVSS

13B1_VH: SEQ ID NO:30

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGSTN
YNEKFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSEDVWGTGTTTVSS

1G4_VH: SEQ ID NO:31

QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTFTGYWIEWIKQRPQGQLEWIGEMLPSGSGSTH
YNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVRSIDYWGQGTTLTVSS

1E7_VH: SEQ ID NO:32

QVQLKQSGPELARPWASVKISCAFYTFSRRVHFAIRDTNYWMQWVKQRPQGQLEWIGA
IYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASGSHYFDYWGQGTTLTV

SS

2D7_VH: SEQ ID NO:33

EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYTLTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDVNPNNDGTT

YNQKFGRATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAICPFYLLGKGTHFDYWGQGTSLTVSS
49C11_VH: SEQ ID NO:34
 EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKFTDYMIWVKQSHGKSLEWIGVIKIYNGGTS
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGPSLYDYPYWFYFDVWGTGTTVTVS
 S
15D9_VH: SEQ ID NO:35
 QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCASGYTFTAYWIEWVKQRPBGHLEWIGEILPGSGTTN
YNENFKDRATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARSYYYASRWFAFWGQGTSLTVSS
2F5_VH: SEQ ID NO:36
 EVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPQGLEWIGDIYPGSGSTN
YNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRRYATAWFAFWGQGTSLTVSS
1B11_VH: SEQ ID NO:37
 QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYYINWVKQRPQGLEWIAIRIYPGSGNTY
YNEKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARNYYISSPWFAFWGQGTSLTVSS
2F2_VH: SEQ ID NO:38
 QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIGNFHPYNDDTK
YNEKFKGKATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDSAVYFCARRVYYSYFWFGYWGHTLTVSS
11B6_VH: SEQ ID NO:39
 QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIGNFHPYNGDSK
YNEKFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCARRHYAASPWFHFWGQGTSLTVSS

Таблица 18. Последовательности VH анти-MASP-3 антитела (области CDR и FR, по Кэбату)

Антитело	HC FR1	HC CDR1
4D5	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
1A10	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
10D12	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	QIQLVQSGPELKTTPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:78)	SYGIT (SEQ ID NO:79)
13B1	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)

1G4	QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTFT (SEQ ID NO:90)	GYWIE (SEQ ID NO:91)
2F5	EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:97)	SYWIT (SEQ ID NO:98)
1B11	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:102)	DYYIN (SEQ ID NO:103)
1E7	QVQLKQSGPELARPWASVKISCQAFYTFSR (SEQ ID NO:108)	RVHFAIRDNTNYWMQ (SEQ ID NO:109)
2F2	QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:113)	TYPIE (SEQ ID NO:114)
11B6	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:120)	TYPIE (SEQ ID NO:114)
2D7	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYTTLT (SEQ ID NO:124)	DYYMN (SEQ ID NO:125)
49C11	EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKFT (SEQ ID NO:131)	DYYMI (SEQ ID NO:132)
15D9	QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCASGYTFT (SEQ ID NO:136)	AYWIE (SEQ ID NO:137)
Антитело	HC FR2	HC CDR2
4D5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
10D12	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	WVKQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:80)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
13B1	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
1G4	WIKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:92)	EMLPGSGSTHYNEKFKG (SEQ ID NO:93)
2F5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	DIYPGSGSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:99)
1B11	WVKQRPGQGLEWIA (SEQ ID NO:104)	RIYPGSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO:105)

1E7	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO:110)
2F2	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO:116)
11B6	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNGDSKYNEKFKG (SEQ ID NO:121)
2D7	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	DVNPNNDGTTYNQKFKG (SEQ ID NO:127)
49C11	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	VIKIYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:133)
15D9	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGSGTTNYNENFKD (SEQ ID NO:138)
Антитело	HC FR3	HC CDR3
4D5	KATLTVDTSSTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
1F3	KATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSG (SEQ ID NO:64)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
4B6	KATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:68)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	KATLTVDVSSSTAFMELHRLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:70)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
10D12	RFAFSLETSARTPYLQINNKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	RFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTTTYFCTR (SEQ ID NO:81)	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
13B1	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
1G4	KATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVR (SEQ ID NO:94)	SIDY (SEQ ID NO:95)
2F5	KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:100)	RRYYATAWFAY (SEQ ID NO:101)
1B11	KATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR (SEQ ID NO:106)	NYIISPWFAY (SEQ ID NO:107)
1E7	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS (SEQ ID NO:111)	GSHYFDY (SEQ ID NO:112)
2F2	KATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDSAVYFCAR (SEQ ID NO:117)	RVYYSYFWFGY (SEQ ID NO:118)
11B6	KATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCAR (SEQ ID NO:122)	RHYAASPWFH (SEQ ID NO:123)

2D7	RATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAI (SEQ ID NO:128)	CPFYYLGKGTDFDY (SEQ ID NO:129)
49C11	KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:134)	GPSLYDYDPYWFYFDV (SEQ ID NO:135)
15D9	RATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAR (SEQ ID NO:139)	SYYYASRWFAF (SEQ ID NO:140)
Антитело	HC FR4	
4D5	WGQGTILVAVSS (SEQ ID NO:61)	
1F3	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
4B6	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1A10	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
10D12	WGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:77)	
35C1	WGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:77)	
13B1	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
1G4	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F5	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1B11	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1E7	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F2	WGHGTLVTVSS (SEQ ID NO:119)	
11B6	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	
2D7	WGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:130)	
49C11	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
15D9	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:66)	

Ниже представлены последовательности переменной области легкой цепи (VL) для каждого высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела. CDR, пронумерованные по Кэбату, подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми независимо от того, пронумерованы ли они по системе Кэбата или Чотия.

Переменные области легкой цепи

4D5_VL: SEQ ID NO:40

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

1F3_VL: SEQ ID NO:41

DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

4B6_VL: SEQ ID NO:42 (SAME for 1A10_VL)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

10D12_VL: SEQ ID NO:43

DVLMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKL
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPWTFGGGTKLEIKR

35C1_VL: SEQ ID NO:44

DIVMTQAPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLSWLLQRPQSPKRLIYLVSKL
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGTKLEIKR

13B1_VL: SEQ ID NO:45

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPTFGGGTKLEIKR

1G4_VL: SEQ ID NO:46

DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQSLVQSNNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKR

1E7_VL: SEQ ID NO:47

DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASOSIGTSIHWHYQORTNGSPRLLIKYASESISGIP
SRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQOSNSWPYTFGGGTKLEIKR

2D7_VL: SEQ ID NO:48

DIQMTQTPASLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWHYQQKPNQTVKLLVFYTSRLHSGVP
SRFSGSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFCQOGFTLPWTFGGGTKVEIKR

49C11_VL:SEQ ID NO:49

DVLMTQTPLSLPVSLGDAQSFSCRSSQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKR

15D9_VL: SEQ ID NO:50

DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCRASQNVGPNLAWYQQKPGQSPKALIYSASYRFSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQOYNRYPTFGSGTKLEIKR

2F5_VL: SEQ ID NO:51

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLISSASNRYTGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFCQOYNSYPLTFGAGTKLELKR

1B11_VL: SEQ ID NO:52

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCRASQNVGPNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQOYNRYPLTFGAGTKLELKR

2F2_VL: SEQ ID NO:53

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCRASQNVGTHVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQOYNSYPRALTFGAGTKLELKR

11B6_VL: SEQ ID NO:54

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCRASQNVGPTVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFCQOYNSYPFTFGSGTKLEIKR

Таблица 19. Последовательности VL анти-MASP-3 антитела (области CDR и FR, по Кэбату и Чотию)

Антитело	LC FR1	LC CDR1
4D5	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1F3	DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSC (SEQ ID NO:148)	KSSQSLLSRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
4B6	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLSRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
1A10*	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:151]	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:149]
10D12	DVLMTQTPLTSLVTIGQFASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
35C1	DIVMTQAPLTSLVTIGQFASISC (SEQ ID NO:158)	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
13B1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1G4	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISC (SEQ ID NO:162)	RSSQSLVQSNNGNTYLH (SEQ ID NO:163)
2F5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC (SEQ ID NO:168)	KASQNVGTAVA (SEQ ID NO:169)
1B11	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO:175)	KASQNVGPNVA (SEQ ID NO:176)

1E7	DIQLTQSPAILSVPGERVSFSC (SEQ ID NO:181)	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO:182)
2F2	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGTHVA (SEQ ID NO:188)
11B6	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGPTVA (SEQ ID NO:191)
2D7	DIQMTQTPASLSASLGDRVTISC (SEQ ID NO:195)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO:196)
49C11	DVLMQTPLSLPVS LGDQASFSC (SEQ ID NO:202)	RSSQSLIHSNGNTYLH (SEQ ID NO:203)
15D9	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC (SEQ ID NO:205)	RASQNVGPNLA (SEQ ID NO:206)
Антитело	LC FR2	LC CDR2
4D5	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1A10	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:143]	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:144]
10D12	WLLQRPQGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	WLLQRPQGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
13B1	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1G4	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
2F5	WYQQKPGQSPKLLIS (SEQ ID NO:170)	SASNRYT (SEQ ID NO:171)
1B11	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
1E7	WYQQR TNGSPRLLIK (SEQ ID NO:183)	YASESIS (SEQ ID NO:184)
2F2	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
11B6	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
2D7	WYQQKPNGTVKLLVF	YTSRLHS

	(SEQ ID NO:197)	(SEQ ID NO:198)
49C11	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
15D9	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRFS (SEQ ID NO:207)
Антитело	LC FR3	LC CDR3
4D5	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
4B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1A10	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:150]	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:146]
10D12	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPYT (SEQ ID NO:160)
13B1	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
1G4	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPFT (SEQ ID NO:167)
2F5	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFC (SEQ ID NO:172)	QQYNSYPLT (SEQ ID NO:173)
1B11	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC (SEQ ID NO:179)	QQYNRYPLT (SEQ ID NO:180)
1E7	GIPSRFTGSGSGTDFTLTISNVESEDIADYYC (SEQ ID NO:185)	QQSNSWPYT (SEQ ID NO:186)
2F2	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNSYPRALT (SEQ ID NO:190)
11B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFC (SEQ ID NO:192)	QQYNSYPFT (SEQ ID NO:193)
2D7	GVPSRFTGSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFC (SEQ ID NO:199)	QQGFTLPWT (SEQ ID NO:200)
49C11	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPWT (SEQ ID NO:204)
15D9	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNRYPFT (SEQ ID NO:208)
Антитело	LC FR4	

4D5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1F3	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
4B6	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1A10	[используемое 4B6 LC: SEQ ID NO:147]	
10D12	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
35C1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
13B1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1G4	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F5	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1B11	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1E7	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F2	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
11B6	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	
2D7	FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:201)	
49C11	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
15D9	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	

*Примечание: легкая цепь для mAb 1A10 не была идентифицирована, а поэтому легкая цепь 4B6 была использована вместе с 1A10 HC.

Таблица 20. Консенсусные последовательности для CDR HC Группы IA

Антитело	Область	Последовательность
4D5	HC-CDR1	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)

1A10	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
Консенсусное	HC-CDR1	XXDIN (SEQ ID NO:209) где: X в положении 1 представляет собой S или T; и X в положении 2 представляет собой N или D
4D5	HC-CDR2	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	HC-CDR2	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
Консенсусное	HC-CDR2	WIYPRDXXXKYNXXFXD (SEQ ID NO:210) где X в положении 7 представляет собой G или D; X в положении 8 представляет собой S, T или R; X в положении 9 представляет собой I или T; X в положении 13 представляет собой E или D; X в положении 14 представляет собой K или E; X в положении 16 представляет собой T или K
4D5	HC-CDR3	LEDTY (SEQ ID NO:60)
1F3	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
4B6	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
Консенсусное	HC-CDR3	XEDXY (SEQ ID NO:211) где X в положении 1 представляет собой L или V, и где X в положении 4 представляет собой T или S

Таблица 21. Консенсусные последовательности для CDR LC Группы IA

Антитело	Область	Последовательность
4D5	LC-CDR1	KSSQSLLN <u>S</u> TRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
4D5-NQ	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
4D5-NA	LC-CDR1	KSSQSLL <u>A</u> SRTRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
4D5-ST	LC-CDR1	KSSQSLLN <u>T</u> TRTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
1F3	LC-CDR1	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)

4B6	LC-CDR1	KSSQSLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
Консенсусное*	LC-CDR1	KSSQSLXXRTRKNYLX (SEQ ID NO:212) где X в положении 8 представляет собой N, I, Q или A; где X в положении 9 представляет собой S или T; и где X в положении 17 представляет собой A или S
4D5	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Консенсусное	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4D5	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
4B6	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
Консенсусное	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)

*Примечание: консенсусная CDR-L1 включает варианты, полученные как описано в примере 19.

Таблица 22. Консенсусные последовательности CDR HC Группы IB

Антитело	Область	Последовательность
10D12	HC-CDR1	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	HC-CDR1	SYGIT (SEQ ID NO:79)
Консенсусное	HC-CDR1	SYGXX (SEQ ID NO:213) где X в положении 4 представляет собой M или I; и где X в положении 5 представляет собой S или T
10D12	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
Консенсусное	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
10D12	HC-CDR3	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	HC-CDR3	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
Консенсусное	HC-CDR3	GGXAXDY (SEQ ID NO:214) где X в положении 3 представляет собой E или D; и где X в положении 5 представляет собой M или L

Таблица 23. Консенсусные последовательности CDR LC Группы IB

Антитело	Область	Последовательность
10D12	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
10D12-DE	LC-CDR1	KSSQSLLDSEGKTYLN (SEQ ID NO:261)
10D12-DA	LC-CDR1	KSSQSLLD S AGKTYLN (SEQ ID NO:262)
10D12-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Консенсусное*	LC-CDR1	KSSQSLLD S XXKTYLX (SEQ ID NO:215) где X в положении 10 представляет собой D, E или A; где X в положении 11 представляет собой G или A; и где X в положении 16 представляет собой N или S
10D12	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
Консенсусное	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
10D12	LC-CDR3	WQGTNFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	LC-CDR3	WQGTNFPYT (SEQ ID NO:160)
Консенсусное	LC-CDR3	WQGTNFPXT (SEQ ID NO: 216) где X в положении 8 представляет собой W или Y

* Примечание: консенсусная CDR-L1 включает варианты, полученные как описано в примере 19. ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи мышиного mAb.

SEQ ID NO: 217: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 4D5 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTT

GTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACCGACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT

GGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGATAGAACTAAGTACAATGACA

AGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTTCCAACACAGCGTACATGGACCTCCA

CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAAGCCTCGAGGATACTTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCGCTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:218: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 1F3 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGGAGTATTAATATAATGAGA
AATTCACGGACAAGGCCACATTGACAGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTACATGGAGCTCCA
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAAGTGTGAGGATTCTTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:219: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 4B6 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAATGAGG
AGTTCACGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATGGAGCTCCA
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTTCAAGTGTGAGGATTCTTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:220: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 1A10 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAATGAGA
AGTTCACGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATGGAGCTCCA
CAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAAGTGTGAGGATTCTTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:221: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 10D12 (родительского)

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGAT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATTTTACAAGCTATGGAATGAGCTGGGTGAGACAGGCTCCA
GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATG
ACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAACCTCTGCCAGAACTCCCTATTTGCAGATCAA
CAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGCGCAAGAGGGGCGAAGCTATGGACTAC
TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA

SEQ ID NO:222: ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 35C1 (родительского)

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGACGCCAGGAGAGACAGTCAAGAT
 CTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATCTTCACATCCTATGGAATTACCTGGGTGAAACAGGCTCCA
 GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATG
 ACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACGTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAA
 CAACCTCAAAAATGAGGACACGACTACATATTTCTGTACAAGAGGGGTGATGCTTTGGACTAC
 TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:223: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой
 цепи 13B1 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCT
 TTCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCCTGGCAAGTGGATAGAGTGGGTAAAACAGAGGCCT
 GGACATGGCCTAGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGA
 AGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCCTGCAGACTCATCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAG
 CAGCCTGACAACTGAAGACTCTGCTATGTATTATTGTTTAAGATCCGAGGATGTCTGGGGCACA
 GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:224: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой
 цепи 1G4 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCT
 TGCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCCTGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACAAGGCCTTGAAGTGGATTGGAGAGATGTTACCTGGAAGTGGTAGTACTCACTACAATGAGA
 AGTTCAAGGGTAAGGCCACATTCCTGCAGATACATCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAG
 CGGCCTGACAACTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGTAAGAAGCATAGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:225: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой
 цепи 1E7 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGCAAGGCCTTGGGCTTCAGTGAAGAT
 ATCCTGCCAGGCTTTCTACACCTTTTCCAGAAGGGTGCACTTTGCCATTAGGGATACCAACTAC
 TGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATCGGGCTATTTATCCTG
 GAAATGGTGATACTAGTTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATC
 CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT
 GCATCCGGTAGCCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:226: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой
 цепи 2D7 (родительского)

GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGGCCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGT
 ATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGCTCACTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCAT
 GGAAAGAGCCTTGAAGTGGATTGGAGATGTTAATCCTAACAATGATGGTACTACCTACAACCAGA
 AATTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTTCCAACACAGCCTCCATGGAGTCCG

CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTACTACTGTGCAATATGCCCTTTTATTACCTCGGT
AAAGGGACCCACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:227: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 49C11 (родительского)

GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGGGAAGAT
GTCCTGTAAGGCTTCTGGATACAAATCTACTGACTACTATATGATCTGGGTGAAGCAGAGCCAT
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAATAATTTATAACGGTGGTACGAGCTACAACCAGA
AGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAA
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGCCATCTCTCTATGATTAC
GACCCCTTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:228: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 15D9 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAAGTGAAGCTGATGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAACCT
TTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATCTACTGCCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCT
GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTACTACTAATAACAATGAGA
ACTTCAAGGACAGGGCCACATCTACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAG
CAGCCTGACAAGTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGATCCTATTACTACGCTAGTAGA
TGGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:229: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 2F5 (родительского)

GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT
GTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACTAATAACAATGAGA
AGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGGAGATACTACGCTACGGCC
TGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:230: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 1B11 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACTGACTACTATATAAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAGGGACTTGAGTGGATTGCAAGGATTTATCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGA
AGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGAAAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAG
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGAAATTAATACTACATTAAGTAGTCCC
TGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:231: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 2F2 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGACGCCTGGAGCCTCAGTGAAGAT
 GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATCCTATAGAGTGGATGAAACAGAATCAT
 GGAAAGAGCCTAGAGTGGATTGGAAATTTTCATCCTTACAATGATGATACTAAGTACAATGAAA
 AGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAAAAATCCTCTAACACAGTCTACTTGGAGCTCAG
 CCGATTAAACATCTGATGACTCTGCTGTTTATTCTGTGCAAGGAGGGTCTACTATAGTTACTTC
 TGGTTTGCTTACTGGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:232: ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи 11B6 (родительского)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGAAACCTGGAGCCTCAGTGAAGAT
 GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATCCTATAGAGTGGATGAAACAGAATCAT
 GGAAAGAGCCTAGAGTGGATTGGAAATTTTCATCCTTACAATGGTGAATCTAAGTACAATGAAA
 AGTTCAAGGGCAAGGCCACCTTGAAGTGTAGAAAAATCCTCTAGCACAGTCTACTTAGAAGTCAG
 CCGATTAAACATCTGATGACTCTGCTATTTATTCTGTGCAAGGAGGCACTACGCTGCTAGTCCC
 TGGTTTGCTCACTGGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (мышинного mAb):

SEQ ID NO:233: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 4D5 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCAC
 TATGACCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGG
 TACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTG
 GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTACCATCAGCAGTGT
 GCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGTACACGTTCCGGAGGG
 GGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:234: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 1F3 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCAC
 TATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAGAACCCGAAAGAACTATTTGTCTTGG
 TACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTG
 GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTACCATCAGCAGTGT
 ACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGTACACGTTCCGGCGGG
 GGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:235: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 4B6/1A10 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCAC
 TATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAGAACCCGAAAGAACTATTTGTCTTGG

TACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGAATCTG
GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGT
ACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTATAATCTGTACACGTTTCGGCGGG
GGGACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:236: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 10D12 (родительского)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTG
TTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAG
TCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGG
GGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCGTGGACGTTTCGGTGGA
GGCACCAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:237: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 35C1 (родительского)

GATATTGTGATGACGCAGGCTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTG
TTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAG
TCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGG
GGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCGTACACGTTTCGGAGGG
GGGACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:238: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 13B1 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCAC
TATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGG
TACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTG
GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGT
GCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATATTCGACGTTTCGGTGGA
GGCACCAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:239: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 1G4 (родительского)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGCTAGTCTTGGAGAACAAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTTGTACAAAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
TCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGA
GGCACCAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:240: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 1E7 ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (родительского)

GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAG
TTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAT
GGTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTA
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGC
AGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAA
ATAAAACGG

SEQ ID NO:241: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 2D7 (родительского)

GATATCCAGATGACACAGACTCCAGCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCAC
CATCAGTTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTTTTAACTGGTATCAACAGAAACCGAAT
GGAAGTGTAAACTCCTAGTCTTCTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGAGCAGAGCATTTCTCTACCATTAGCAACCTGGAGCAGGAAGATGTTGC
CACTTACTTTTGCCAACAGGGTTTTACGCTTCCGTGGACGTTTCGGTGGGGACCAAGGTGGAA
ATCAAACGG

SEQ ID NO:242: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 49C11 (родительского)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGTCTTGAGATCAAGCCTC
CTTCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTATACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGG
TCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGG
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTCCGTGGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:243: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 15D9 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAG
CGTCACCTGCAGGGCCAGTCAGAAATGTGGGTCCCAATTTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGG
CAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGATTAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCA
CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGC
AGAGTATTTCTGTGAGCAATATAACAGGTATCCATTACGTTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAA
ATAAAACGG

SEQ ID NO:244: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 2F5 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAG

CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGA
 CAATCTCCTAAACTACTGATTTCCCTCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCA
 CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAATATGCAGTCTGAAGACGTGGC
 AGATTATTTCTGCCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAG
 CTGAAACGG

SEQ ID NO:245: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 1B11 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACTTCAGTAGGAGACAGGGTCAG
 CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGG
 CAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCA
 CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGC
 AGACTATTTCTGTGAGCAATATAACCGCTATCCTCTCACGTTCTGGTGCTGGGACCAAACTGGAG
 CTGAAACGG

SEQ ID NO:246: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 2F2 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAA
 CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTCATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGG
 CAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCTACCGGTACAGTGGCGTCCCTGATCGCTTCA
 CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACCTGGC
 AGAGTATTTCTGTGAGCAATATAACAGCTATCCTCGAGCGCTCACGTTCTGGTGCTGGGACCAAG
 CTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:247: ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи 11B6 (родительского)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAA
 CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCTACTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGG
 CAATCTCCTAAAGCACTAATTTACTCGGCATCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCA
 CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCACTCTGAAGACTTGGC
 AGAGTATTTCTGTGAGCAATATAACAGCTATCCATTCACGTTCTGGCTCGGGACAAAGTTGGAA
 ATAAACGG

SEQ ID NO:310: Константная область человеческого IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:311: Константная область человеческого IgG4 с мутацией S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDRKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTKQSLSLSLGK

SEQ ID NO:312: Константная область человеческого IgG4 с мутацией S228P, а также с мутацией (Xtend), которая стимулирует взаимодействия с FcRn при низком pH

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDRKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSH YTKQSLSLSLGK

SEQ ID NO:313: Константная область человеческого IgK
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 16.

В этом примере описана функциональная характеристика рекомбинантных очищенных высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител в нескольких анализах *in vitro*.

Методы.

Рекомбинантные анти-MASP-3 mAb, полученные как описано в примерах 11 и 14, были охарактеризованы на (i) связывание с человеческим MASP-3 и MASP-3 других видов; (ii) способность ингибировать расщепление искусственного субстрата; (iii) способность ингибировать расщепление про-фактора D с образованием фактора D; (iv) ингибирование осаждения комплемента в человеческой сыворотке и (v) ингибирование лизиса кроличьих эритроцитов в человеческой сыворотке, как описано ниже.

1. Анализы на связывание с человеческим и мышинным MASP-3.

ELISA-анализы.

Анализ на связывание MASP-3 с очищенными рекомбинантными анти-MASP-3 mAb.

Человеческий MASP-3.

Был проведен "сэндвич"-ELISA-анализ для оценки связывания 16 очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 антител с человеческим MASP-3 (фрагментом CCP1-CCP2-SP) следующим образом. ELISA-планшет покрывали антителом α M3-259 в количестве 4 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере в течение ночи при 4°C. α M3-259 представляет собой высокоаффинное рекомбинантное химерное "куриное-человеческое" анти-MASP-3 mAb, продуцируемое у кур, иммунизированных областью CCP1-CCP2-SP человеческого MASP-3. Исследования по картированию доменов показали, что α M3-259 связывается с областью CCP1-CCP2 MASP-3, происходящего от множества видов, включая человека, собакоподобных обезьян, мышей, крыс и собак. Как показано на фиг. 51C, α M3-259 также связывается с MASP-1.

Затем планшет блокировали 1% BSA/PBS, промывали в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с MASP-3 CCP1-CCP2-SP (2 мкг/мл). Затем планшет промывали (PBS-T, 0,05%) и добавляли анти-MASP-3 антитела-кандидаты с последующим инкубированием в течение одного часа при комнатной температуре. Планшет промывали (PBS-T, 0,05%) и добавляли детектирующее антитело (мышинное ПХ-конъюгированное антитело против человеческой каппа-цепи, SouthernBiotech #9230-05) в течение одного часа при комнатной температуре. После другой промывки (PBS-T, 0,05%), планшет проявляли (5 мин) реагентом OPT EIA TMB (BD Biosciences #555214). Считывание оптической плотности на A450 осуществляли на планшет-ридере Spectramax M5e.

Результаты.

На фиг. 51A и на 51B графически проиллюстрированы avidности связывания анти-MASP-3 mAb (очищенных рекомбинантных) с человеческим MASP-3 (CCP1-CCP2-SP). Как показано на фиг. 51A, на фиг. 51B и в табл. 24, анти-MASP-3 mAb обладают высокой avidностью связывания с человеческим MASP-3, т.е. в пределах от 0,241 нМ до 0,023 нМ. Эти величины в 10-100 раз ниже, чем величины, сообщаемые для ранее описанных анти-MASP-3 mAb (см. здесь пример 7, а также пример 15 в опубликованной заявке WO 2013/192240).

Специфичность связывания анти-MASP-3 mAb.

Для определения специфичности связывания высокоаффинных анти-MASP-3 mAb с MASP-3 были проведены эксперименты по связыванию для оценки связывания 16 очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 антител с человеческим MASP-1 и с человеческим MASP-2. Связывание определяли, как описано в ELISA-анализе на связывание с MASP-3, за исключением того, что рекомбинантный MASP-1A (S646A, фрагмент CCP1-CCP2-SP) и MASP-2 (фрагмент CCP1-CCP2-SP) иммобилизовали непосредственно на планшете.

Результаты.

На фиг. 51С графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные высокоаффинные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, селективно связываются с MASP-3, но не связываются с человеческим MASP-1.

На фиг. 51D графически проиллюстрированы результаты эксперимента по связыванию, где репрезентативные очищенные рекомбинантные высокоаффинные антитела, ингибирующие человеческий MASP-3, селективно связываются с MASP-3, но не связываются с человеческим MASP-2.

Мышиный MASP-3.

Связывание анти-MASP-3 mAb с мышиным MASP-3 оценивали как описано выше для человеческого MASP-3, за исключением того, что рекомбинантный полноразмерный мышиный MASP-3 (SEQ ID NO: 3) захватывали на планшете с α M3-259. mAb, которое служило в качестве негативного контроля, используемого в обоих экспериментах, представляет собой mAb77, а именно, рекомбинантное химерное "куриное-человеческое" mAb, продуцируемое у тех же иммунизированных кур, у которых продуцировалось α M3-259, однако, mAb77 не связывается с мышиным MASP-3.

Результаты.

На фиг. 52 графически проиллюстрированы avidности репрезентативных анти-MASP-3 mAb (очищенных рекомбинантных) по отношению к мышиному полноразмерному MASP-3. Как показано на фиг. 52, большинство тестируемых анти-MASP-3 mAb также обладали высокой avidностью связывания с мышиным MASP-3.

Величины avidности (EC_{50}) связывания 16 рекомбинантных химерных анти-MASP-3 mAb с человеческим и мышиным MASP-3 систематизированы в табл. 24.

Таблица 24. Avidность связывания анти-MASP-3 mAb с человеческим и мышиным MASP-3 (фиг. 51A, 51B и 52)

Клон антитела	Антиген, используемый для получения mAb	Avidность связывания с человеческим MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) (EC_{50} нМ)	Avidность связывания с мышиным MASP-3 (полноразмерным) (EC_{50} нМ)
1A10*	SP	0,241	0,15
1B11	SP	0,059	1,10
1E7	SP	0,112	117,00
1F3	SP	0,236	0,111
1G4	SP	0,177	3,70
2D7	SP	0,122	NA
2F2	SP	0,057	0,105
2F5	SP	0,073	0,102
4B6	SP	0,211	0,188
4D5	SP	0,058	0,098
10D12	CCP1-CCP2-SP	0,089	0,081
11B6	CCP1-CCP2-SP	0,060	0,066
13B1	CCP1-CCP2-SP	0,059	0,035
15D9	CCP1-CCP2-SP	0,074	0,092
35C1	CCP1-CCP2-SP	0,091	0,209
49C11	CCP1-CCP2-SP	0,069	0,064

Три анти-MASP-3 mAb, 13B1, 10D12 и 4D5, были также протестированы на связывание с рекомбинантным MASP-3 собакоподобных обезьян, собак и крыс. Эти результаты систематизированы ниже в табл. 25.

Таблица 25. Систематизированное описание экспериментов
по перекрестному связыванию анти-MASP-3 mAb

Происхождение MASP-3	Ранжирование по связыванию с Fab
Человек	13B1 (пМ) $\approx$ 10D12 (пМ) $\approx$ 4D5 (пМ)
Собакоподобная обезьяна	13B1 (пМ) $\approx$ 4D5 (пМ) > 10D12 (пМ)
Собака	13B1 (пМ) > 10D12 (пМ) >> 4D5 (нМ)
Крыса	13B1 (пМ) $\approx$ 10D12 (пМ) >> 4D5 (нМ)
Мышь	10D12 (пМ) > 13B1 (пМ) >> 4D5 (нМ)

Как показано в табл. 25, анти-MASP-3 mAb 13B1, 10D12 и 4D5 связываются с тестируемыми MASP-3 всех пяти видов (человека, мышей, крыс, собак и собакоподобных обезьян). Эти mAb связываются с человеческим MASP-3 с высокой степенью авидности (≤ 500 пМ), но с MASP-3 других видов они связываются с различными авидностями.

2. Флуорогенный анализ на расщепление трипептидов.

Предпосылки/Обоснования.

Было показано, что MASP-3, помимо его известных природных субстратов (Iwaki et al., J. Immunol. 187:3751, 2011; Cortesio and Jiang, Arch. Biochem. Biophys. 449:164-170, 2006), гидролизует различные трипептидные субстраты (Cortesio and Jiang, там же). Эти молекулы, как и очень небольшие субстраты, могут быть использованы для картирования каталитического сайта протеазы. Ингибирование расщепления трипептида является показателем того, что ингибирующий агент, такой как антитело, либо непосредственно блокирует доступ небольшого субстрата к каталитическому сайту, либо инициирует конформационный сдвиг в домене SP, который аналогичным образом блокирует такой доступ. Так, например, предполагается, что такое антитело может также блокировать катализ крупных природных субстратов благодаря негативному влиянию на активный центр фермента. По своей функции оно больше всего соответствует антителу у мышей с отсутствием MASP-3 или у ЗМС-пациентов (дефицитных по MASP-3).

Методы.

Отитрованные рекомбинантные mAb (с 3-кратными разведениями от 666 нМ до 0,91 нМ) инкубировали с MASP-3 CCP1-CCP2-SP (197 нМ) в течение 15 мин при комнатной температуре. Трипептидный субстрат BOC-V-P-R-AMC (трет-бутилоксикарбонил-Val-Pro-Arg-7-амино-4-метилкумарин) (R&D Systems, Cat. № ES011) добавляли в конечной концентрации 0,2 мМ. Гидролиз амидной связи Arg-AMC способствовал высвобождению AMC, т.е. в высокой степени флуоресцентной группы. Кинетические значения для возбуждения на 380 нм/излучения на 460 нм регистрировали через каждые 5 мин при 37°C в течение 70 мин на флуоресцентном планшет-ридере Spectramax M5e.

Результаты.

На фиг. 53 графически проиллюстрированы результаты анализа на ингибирование MASP-3-зависимого расщепления флуорогенного трипептида под действием моноклональных антител против MASP-3. Как показано на фиг. 53, тестируемые анти-MASP-3 mAb были отнесены к трем различным группам.

1. Анти-MASP-3 mAb, которые являются сильными ингибиторами расщепления пептида под действием MASP-3: 1A10 (29,77 нМ), 1G4 (29,64 нМ), 1F3 (32,99 нМ), 4B6 (26,03 нМ), 4D5 (27,54 нМ), 10D12 (30,94 нМ) and 13B1 (30,13 нМ).

2. Анти-MASP-3 mAb, которые являются слабыми или очень слабыми ингибиторами расщепления пептида под действием MASP-3: 15D9, 11B6, 2F5, 1E7 и 2D7.

3. Анти-MASP-3 mAb, которые являются нейтральными или могут стимулировать расщепление пептида под действием MASP-3: 1B11; 2F2; 77 (контрольное mAb).

3. Ингибирование расщепления про-фактора D с образованием фактора D.

Методы.

Активный рекомбинантный человеческий белок MASP-3 (240 нг на реакцию) предварительно инкубировали с репрезентативными анти-MASP-3 mAb и с контрольным mAb (которые связываются с MASP-1, но не с MASP-3) в GVB⁺⁺-буфере в полном объеме 9 мкл при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем в каждую пробирку добавляли 70 нг про-фактора D с N-концевой эпитопной меткой Strep-tag II (ST-про-фактора D-His) до конечного объема 10 мкл на реакцию. Реакционные смеси инкубировали в термоячейке при 37°C в течение 6 ч. После этого одну десятую от каждой реакционной смеси подвергали электрофорезу в 12% бис-трис-геле для высвобождения про-фактора D и получения активного продукта расщепления фактора D. Полученные белки переносили на ПВДФ-мембрану и анализировали с помощью вестерн-блот-анализа путем детектирования с использованием биотинилированного антитела против фактора D (R&D Systems).

Результаты.

На фиг. 54 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ, указывающий на способность репрезентативных анти-MASP-3 mAb блокировать расщепление про-CFD, опосредуемое рекомбинантным MASP-3 с

образованием CFD в анализе *in vitro*. Как показано на фиг. 54, было обнаружено, что репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb 13B1, 4B6, 1G4, 2D7, 10D12, 1A10, 4D5, 1E7, 1F3 и химерные mAb "мышь-человек" не способны к полному ингибированию расщепления про-CFD в этом анализе.

4. Анализ на осаждение фактора Bb на зимозане.

Методы.

Анти-MASP-3 mAb в различных концентрациях добавляли к 10% CFD-дефицитной человеческой сыворотке (Complement Technology A336) и GVB+Mg/EGTA (20 nM) и инкубировали в течение 30 мин на льду, а затем добавляли рекомбинантный ST-про-фактор D-His (в конечном объеме 2 мкг/мл) и зимозан (в конечном объеме 0,1 мг/мл). Частицы зимозана функционируют как активирующая поверхность для осаждения комплемента. Смесь инкубировали при 37°C, а затем измеряли активность APC посредством детектирования фактора Bb комплемента на проточном цитометре (с использованием антитела Quidel A252) на поверхности частиц зимозана.

Результаты.

На фиг. 55A графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Bb на частицах зимозана (определенный посредством проточного цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций анти-MASP-3 mAb 1F3, 1G4, 2D7 и 4B6 в человеческой сыворотке с дефицитом фактора D при 37°C в течение 70 мин.

На фиг. 55B графически проиллюстрирован уровень осаждения фактора Bb на частицах зимозана (определенный посредством проточного цитометрического детектирования в единицах MFI) в присутствии различных концентраций анти-MASP-3 mAb 4D5, 10D12 и 13B1 в человеческой сыворотке с дефицитом CFD при 37°C в течение 70 мин.

Результаты, представленные на фиг. 55A и 55B, систематизированы ниже в табл. 26.

Таблица 26. Ингибирование осаждения фактора Bb на зимозане под действием анти-MASP-3 mAb (фиг. 55A и 55B)

Антитело	Ингибирование осаждения фактора Bb на зимозане (IC ₅₀ нМ)
1F3	0,1
1G4	1,1
2D7	3,5
4B6	0,2
4D5	0,4
10D12	0,5
13B1	0,3

Как показано на фиг. 55A, на фиг. 55B и в табл. 26, анти-MASP-3 mAb обнаруживают сильное ингибирование APC в человеческой сыворотке с величинами IC₅₀ от 0,1 до 3,5 нМ. Эти результаты продемонстрировали, что MASP-3 играет ключевую роль в активации APC у модели *in vitro* в человеческой сыворотке, и также продемонстрировали, что MASP-3-ингибирующие антитела являются сильными ингибиторами APC.

5. Анализ на способность репрезентативных анти-MASP-3 mAb ингибировать лизис кроличьих эритроцитов.

Методы.

Для мониторинга ингибирования APC в другом эксперименте, авторами была проведена оценка способности репрезентативных анти-MASP-3 mAb блокировать лизис кроличьих эритроцитов в человеческой сыворотке. Анти-MASP-3 mAb в различных концентрациях добавляли к 10% человеческой сыворотке, дефицитной по фактору D, и к GVB+Mg/EGTA (20 nM), а затем инкубировали в течение 30 мин на льду, после чего добавляли рекомбинантный ST-про-фактор B-His (в конечном объеме 2 мкг/мл) и эритроциты (в конечном объеме $2,5 \times 10^8$ клеток/мл). Смеси инкубировали при 37°C в течение 70 мин и оценивали степень APC-опосредованного гемолиза путем разведения реакционных смесей и измерения оптической плотности (A405), которая указывает на уровни свободного гемоглобина.

Результаты.

На фиг. 56A графически проиллюстрирован уровень ингибирования лизиса кроличьих эритроцитов в присутствии различных концентраций анти-MASP-3 mAb 1A10, 1F3, 4B6, 4D5, 1G4 и 2F2 в CFD-дефицитной человеческой сыворотке. На фиг. 56B графически проиллюстрирован уровень ингибирования лизиса кроличьих эритроцитов в присутствии различных концентраций анти-MASP-3 mAb 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 и 2F5 в CFD-дефицитной человеческой сыворотке. Результаты систематизированы в табл. 27.

Таблица 27. Ингибирование лизиса кроличьих эритроцитов под действием анти-MASP-3 mAb (фиг. 56A и 56B)

Антитело	Ингибирование лизиса кроличьих эритроцитов (IC ₅₀ нМ)
1A10	0,2
1F3	0,2
4B6	0,2
4D5	0,1
1G4	2,7
2F2	0,8
1B11	NA
1E7	NA
2D7	5,4
2F5	0,9

Как показано на фиг. 56A, 56B и в табл. 27, анти-MASP-3 mAb обнаруживают ингибирование APC-индуцированного гемолиза кроличьих эритроцитов с величинами IC₅₀ от 0,1 до 5,4 нМ. Эти результаты соответствуют наблюдениям анти-MASP-3 антител в анализе с использованием зимозана, а также указывают на то, что MASP-3-ингибирующие антитела являются сильными ингибиторами APC.

6. Ингибирование расщепления про-фактора D в сыворотке ЗМС-пациента.

Методы.

Репрезентативное рекомбинантное анти-MASP-3 mAb (4D5) тестировали на его способность блокировать расщепление про-фактора D (и его активацию) под действием MASP-3 в нормальной человеческой сыворотке и в сыворотке ЗМС-пациента В ("Pat B"), т.е. индивидуума, у которого MASP-3 не детектируется в сыворотке, и у которого имеется дефицит APC.

Сыворотку здорового человека и сыворотку Пациента В (в конечном объеме 10%) и GVB+Mg/EGTA (30 нМ) инкубировали в отсутствии фермента или в присутствии активного рекомбинантного MASP-3 (rMASP-3; 0,5 мкг/мл), неактивного rMASP-3 или активного rMASP-3 плюс анти-MASP-3 mAb 4D5 (в конечной концентрации 500 нМ) на льду в течение 1 часа. Затем добавляли зимозан (в конечной концентрации 0,1 мг/мл) и смеси инкубировали при 37°C. Через 2 ч пробы центрифугировали и супернатанты собирали. Пробы подвергали иммунопреципитации козьим антителом против человеческого фактора D (R&D Systems AF1824), термоденатурации и обработке пептид-N-гликозидазой (New England Biolabs P0704L). Захваченные и дегликозилированные белки разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, и гели подвергали электроблоттингу в вестерн-блот-анализе с использованием биотинилированного анти-CFD антитела (R&D Systems BAF1824) и высокочувствительного стрептавидина-ПХ (Thermo Fischer Scientific 21130).

Результаты.

На фиг. 57 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения уровня про-фактора D и фактора D в сыворотке ЗМС-пациента В в присутствии активного rMASP-3, неактивного rMASP-3 и активного rMASP-3 плюс mAb 4D5. Как показано на фиг. 57, нормальная человеческая сыворотка содержит преимущественно зрелую форму, а сыворотка Пациента В содержит, главным образом, фактор D в форме зимогена. Как показано также на фиг. 57, активный rMASP-3 в присутствии зимозана расщепляет про-фактор D в сыворотке Пациента В, а неактивная (зимогенная) форма MASP-3 не обладает такой функцией. И наконец, как показано на фиг. 57, анти-MASP-3 mAb 4D5 блокирует расщепление про-фактора D в сыворотке Пациента В в присутствии активного rMASP-3. Эти результаты также указывают на определенную роль MASP-3 в расщеплении про-фактора D и активации APC и на то, что MASP-3-ингибирующее mAb способно блокировать MASP-3-опосредуемое расщепление про-фактора D и блокировать APC.

Пример 17. Анализ репрезентативных MASP-3-ингибирующих mAb 10D12 и 13B1 на их способность ингибировать APC *in vivo*.

1. Ингибирование APC под действием mAb M3-1 (13B1) и 10D12 *in vivo*.

Методы.

Для определения эффективности анти-MASP-3 mAb (M3-1) и 10D12 в ингибировании APC *in vivo*, группе мышей (n=4) вводили в хвостовую вену одну внутривенную инъекцию 10 мг/кг mAb 13B1, а второй группе мышей (n=4) вводили в хвостовую вену одну внутривенную инъекцию 10 мг/кг mAb 10D12. Кровь, взятую у животных, использовали для получения сыворотки и для создания матрицы для оценки активности APC с помощью проточной цитометрии в анализе *ex vivo*, который позволяет определять уровень осаждения C3 (также C3b и iC3b, Dako F020102-2) на частицах зимозана. Сыворотку, полученную из крови, взятой до введения дозы и через некоторое время после введения дозы (через 96 ч, 1 и 2 недели) разводили до 7,5% и добавляли частицы зимозана (в конечной концентрации 0,1 мг/мл) для ин-

дуцирования APC. Мышей, обработанных антителом, сравнивали с группой контрольных мышей (n=4), которым вводили одну внутривенную дозу носителя.

Результаты.

На фиг. 58 графически проиллюстрирован уровень осаждения C3 на частицах зимозана в различные периоды времени после введения одной дозы mAb M3-1 (13B1), mAb 10D12 или носителя у мышей дикого типа. Как показано на фиг. 58, до введения дозы, в этих трех случаях наблюдались сравнимые уровни активности APC.

Через 96 ч и через два последующие промежутка времени у группы, обработанной mAb, наблюдалось почти полное ингибирование системной активности APC, а активность APC у группы, обработанной носителем, оставалась на том же уровне.

Эти результаты продемонстрировали, что анти-MASP-3 mAb M3-1 (13B1) и mAb 10D12 являются сильными ингибиторами APC у мышей *in vivo*.

2. Статус фактора В у мышей, обработанных анти-MASP-3 mAb 10D12.

Методы.

В процессе превращения зимогена фактора В в активный протеолитический фермент, фактор В расщеплялся под действием фактора D с образованием фрагментов Ba (~30 кДа) и Bb (~60 кДа). Статус фрагмента Ba в мышинной сыворотке, взятой у мышей, обработанных анти-MASP-3 mAb 10D12, определяли следующим образом.

Мышам (n=4) в хвостовую вену вводили две инъекции по 10 мг/кг mAb 10D12. Обработку проводили через 7 дней, а затем через три дня после второй инъекции, у животных брали кровь. Второй группе из четырех мышей вводили одну внутривенную дозу носителя (PBS). Кровь, взятую у обеих групп, использовали для получения сыворотки в качестве матрицы для активации комплемента. К разведенной сыворотке (в конечном разведении 7,5%) добавляли частицы зимозана (в конечной концентрации 0,1 мг/мл) и инкубировали в течение 35 мин при 37°C.

Результаты.

Для оценки активации APC на фиг. 59 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения статуса фрагмента Ba в мышинной сыворотке, взятой у мышей, обработанных mAb 10D12 или PBS и стимулированных зимозаном. На фиг. 59, каждая дорожка соответствует каждой отдельной мыши, а другие дорожки соответствуют сыворотке, взятой у репрезентативной мыши, обработанной носителем, и у мыши, обработанной анти-MASP-3 mAb, используемых для сравнения. На дорожках 1 и 2 показаны два контрольных случая, т.е. мыши, обработанные носителем или mAb 10D12, соответственно (если смотреть с левой стороны от блота), в качестве примеров репрезентативных базальных уровней Ba, присутствующего в пробах сыворотки в отсутствие зимозана. Все дорожки 3-10 соответствуют уровню фрагмента Ba, присутствующего после инкубирования с зимозаном. Во всех случаях, у мышей, обработанных анти-MASP-3 mAb, наблюдались пониженные уровни фрагмента Ba по сравнению с уровнями у животных, обработанных носителем.

3. Сыворотка мышей, обработанных mAb 10D12, ингибирует гемолиз.

Методы.

Для дополнительной оценки ингибирования APC MASP-3-ингибирующими антителами, авторами настоящего изобретения был проведен анализ на способность анти-MASP-3 антител блокировать лизис кроличьих эритроцитов в сыворотке мышей, обработанных репрезентативным анти-MASP-3 mAb 10D12 по сравнению с сывороткой контрольных мышей, обработанных носителем.

Мышам (n=4/группу) в хвостовую вену вводили три инъекции контроля-носителя (PBS), 10 мг/кг анти-MASP-3 mAb 10D12 или 25 мг/кг анти-MASP-3 mAb 10D12. Обработку проводили с перерывами в семь дней и через три дня после третьей инъекции у животных брали кровь. Кровь использовали для получения сыворотки в качестве матрицы для реакций гемолиза. К 20% сывороточному пулу, взятому у четырех мышей, добавляли эритроциты (в конечном объеме $2,5 \times 10^8$ клеток/мл) в GVB+Mg/EGTA (20 нМ). Смеси инкубировали при 37°C и оценивали степень APC-опосредованного гемолиза путем разведения реакционных смесей и измерения оптической плотности (A405).

Результаты.

На фиг. 60 графически проиллюстрирован уровень ингибирования гемолиза 20% сывороткой мышей, обработанных анти-MASP-3 mAb 10D12 (10 мг/кг или 25 мг/кг) или контрольным носителем. Как показано на фиг. 60, сыворотка мышей, обработанных анти-MASP-3 mAb 10D12 в концентрации 10 мг/кг и 25 мг/кг, обнаруживала меньшую степень общего гемолиза в течение 1-часового тестирования по сравнению с мышами, обработанными носителем.

Общие выводы исходя из результатов.

Как описано в этом примере, репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb 13B1 и 10D12 ингибируют APC *in vivo*. Как описано в примере 12, было определено, что моноклональное анти-MASP-3 антитело 13B1 (также обозначаемое mAb M3-1) дает явное преимущество с точки зрения жизнеспособности эритроцитов, не содержащих Cту, у мышей с моделью пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). Как описано в примере 13, было определено, что анти-MASP-3 mAb M3-1 снижало оценки заболеваемости и тяжести артрита в зависимости от дозы.

Пример 18.

В этом примере описаны результаты анализа на связывание эпитопа с высокоэффективными MASP-3-ингибирующими mAb.

1. Анализ на конкурентное связывание.

Методы.

96-луночные планшеты для ELISA-анализа покрывали антителом для захвата, α M3-259, mAb изотипа IgG4, которые, как было показано, связываются с областью CCP1-CCP2 MASP-1 и MASP-3. Полноразмерный человеческий белок MASP-3 иммобилизовали на планшете посредством антитела для захвата α M3-259. В отдельных лунках без покрытий, 2-кратное разведение серии тестируемых анти-MASP-3 mAb изотипа IgG4 смешивали с другим тестируемым анти-MASP-3 антителом изотипа IgG1 в одной и той же концентрации. Эту смесь добавляли к лункам с покрытием и оставляли для связывания с захваченным MASP-3. Потенциальное конкурентное связывание этих двух антител определяли путем детектирования изоформы IgG1 с использованием ПХ-конъюгированного антитела против шарнирной области человеческого IgG1 (Southern Biotech 9052-05), и с использованием серии реагентов, являющихся субстратами для TMB (BD Biosciences 555214).

Результаты.

На фиг. 61A-61E графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание.

На фиг. 61A графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 4D5 (IgG1) и человеческим MASP-3.

На фиг. 61B графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 10D12 (IgG1) и человеческим MASP-3.

На фиг. 61C графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 13B1 (IgG1) и человеческим MASP-3.

На фиг. 61D графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 1F3 (IgG1) и человеческим MASP-3.

На фиг. 61E графически проиллюстрированы результаты анализа на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 1G4 (IgG1) и человеческим MASP-3.

Данные на фиг. 61A-61E систематизированы ниже в табл. 28.

Эти данные показали, что анти-MASP-3 mAb 4D5, 10D12, 13B1, 1A10, 1F3 и 1G4 имеют общий эпитоп или перекрывающийся эпитоп на человеческом MASP-3. Неожиданно было обнаружено, что 1G4 обладает очень ограниченной способностью блокировать связывание других пяти mAb с MASP-3, но эти mAb почти полностью блокируют связывание 1G4 с MASP-3.

2. Анализ на связывание mAb с пептидами, представляющими собой эпитопы MASP-3 линейного и прерывистого типа.

Методы.

14 из 16 анти-MASP-3 mAb оценивали с помощью анализа Pepscan для идентификации областей MASP-3, с которыми они связываются. Для реконструирования линейных и потенциальных прерывистых эпитопов молекулы-мишени синтезировали библиотеку пептидов, соответствующих аминокислотным остаткам 299-728 SEQ ID NO: 2 (человеческого MASP-3). Аминокислотные остатки 1-298 MASP-3 не присутствовали в иммуногене и не были включены в этот анализ.

Анализ эпитопов Pepscan включает применение технологии CLIPS, которая фиксирует пептиды в определенных трехмерных структурах (см. Timmerman et al., J. Mol. Recogn. 20:283-299, 2007 и Langedijk et al., Analytical Biochemistry 417:149-155, 2011). Связывание каждого антитела с каждым синтезированным пептидом тестировали в ELISA-анализе на основе Pepscan.

Результаты.

Результаты связывания пептидов в анализе Pepscan с каждым анализируемым антителом описаны ниже и систематизированы в табл. 4, табл. 28 и на фиг. 62-67.

Антитела 1F3, 4B6, 4D5 и 1A10 (Группы IA).

При тестировании в условиях умеренной жесткости, антитела 1F3, 4B6, 4D5 и 1A10 связывались с прерывистыми эпитопами-миметиками, а также с простыми конформационными и линейными миметиками. Анализ данных показал, что все антитела 1F3, 4B6, 4D5 и 1A10 преимущественно распознавали пептидный фрагмент ⁴⁹⁸VLSQRRTTVI⁵⁰⁹ (SEQ ID NO: 9) MASP-3. Этот пептид находится в непосредственной близости от гистидина активного центра H497. Данные, полученные для этих антител, связывающихся с прерывистыми миметиками, позволяют предположить, что пептидные фрагменты ⁵⁴⁴DFNIQNYNHDIALVQ⁵⁵⁸ (SEQ ID NO: 11), ⁶³⁹GNYSVTENMFC⁶⁴⁹ (SEQ ID NO: 13) и ⁷⁰⁴VSNYVDWVWE⁷¹³ (SEQ ID NO: 14) MASP-3 также участвуют в связывании. Пептид

⁵⁴⁴DFNIQNYNHDIALVQ⁵⁵⁸ (SEQ ID NO: 11) содержит аспартат в активном центре (D553).

Антитело 10D12 (Группы IB).

При тестировании в условиях умеренной жесткости, антитело 10D12 связывалось с пептидами, имеющими коровую последовательность ⁴⁹⁸VLRSSRRDITVI⁵⁰⁹ (SEQ ID NO: 9) MASP-3, где указанная последовательность расположена поблизости от гистидина активного центра, H497.

Антитело 13B1 (Группы IC).

При тестировании в условиях умеренной жесткости антитело 13B1 распознавало прерывистый эпитоп, содержащий пептидные фрагменты ⁴⁹⁴TAAHVLRSSRRDITVI⁵⁰⁸ (SEQ ID NO: 10) и ⁶²⁶PHAECKTSYESRS⁶³⁸ (SEQ ID NO: 12) MASP-3, где пептидный фрагмент ⁶²⁶PHAECKTSYESRS⁶³⁸ (SEQ ID NO: 12), очевидно, является доминантной частью эпитопа, поскольку он может также связываться в простой конформационной форме. Пептид ⁴⁹⁴TAAHVLRSSRRDITVI⁵⁰⁸ (SEQ ID NO: 10) включает гистидин активного центра, H497.

Антитело 1G4 (Группы II).

При тестировании в условиях низкой жесткости, антитело 1G4 распознавало прерывистый эпитоп, содержащий пептидные фрагменты ⁴⁵⁴RNAEPGLFPWQ⁴⁶⁴ (SEQ ID NO: 17), ⁵¹⁴EHVTVYLGLH⁵²³ (SEQ ID NO: 19) и ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) MASP-3, где пептидный фрагмент ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) представляет собой доминантную часть эпитопа. Этот доминантный пептид входит в область трех аминокислот активного центра с серином, S664.

Антитела 1E7 и 2D7 (Группы IIIA).

При тестировании в условиях высокой и низкой жесткости, соответственно, антитела 1E7 и 2D7 распознавали прерывистый эпитоп, содержащий пептидные фрагменты ⁴⁵⁴RNAEPGLFPWQ⁴⁶⁴ (SEQ ID NO: 17), ⁵¹⁴EHVTVYLGLH⁵²³ (SEQ ID NO: 19) и ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) MASP-3, где пептидный фрагмент ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) представляет собой доминантную часть эпитопа и входит в область трех аминокислот активного центра с серином, S664.

Антитела 2F5 и 15D9 (Группы IIIB).

При тестировании в условиях низкой жесткости антитела 2F5 и 15D9 доминантно распознавали прерывистый эпитоп, содержащий пептидные фрагменты ⁴⁵⁴RNAEPGLFPWQ⁴⁶⁴ (SEQ ID NO: 17), ⁴⁷⁹KWFGSGALLSASWIL⁴⁹³ (SEQ ID NO: 18), ⁵⁶²PVPLGPHVMP⁵⁷¹ (SEQ ID NO: 20) и ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) MASP-3. Пептиды ⁴⁷⁹KWFGSGALLSASWIL⁴⁹³ (SEQ ID NO: 18) и ⁶⁶⁷AFVIFDDLSQRW⁶⁷⁸ (SEQ ID NO: 23) локализованы в области четырех или трех аминокислотных остатков активного центра H497 и S664, соответственно.

Антитело 1B11 (Группы IIIC).

При тестировании в условиях умеренной жесткости, антитело 1B11 распознавало прерывистый эпитоп, содержащий пептидные фрагменты ⁴³⁵ECGQPSRSLPSLV⁴⁴⁷ (SEQ ID NO: 16), ⁴⁵⁴RNAEPGLFPWQ⁴⁶⁴ (SEQ ID NO: 17), ⁵⁸³APHMLGL⁵⁸⁹ (SEQ ID NO: 21) и ⁶¹⁴SDVLQYVKLP⁶²³ (SEQ ID NO: 22) MASP-3.

Таблица 28. Систематизированные данные анализа на связывание с эпитопом

Анти-MASP-3 mAb рег. No./Группу	Пептид-связывающие фрагменты (эпитопы) на человеческом MASP-3 (с лидерной последовательностью)	Конкурируют с антителами	Анализ на расщепление пептида
4D5 Группы IA	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁹ TTVI (SIN:9) ⁵⁴⁴ DFNIQNYNHDIALVQ ⁵⁵⁸ (SIN:11) ⁶³⁹ GNYSVTENMFC ⁶⁴⁹ (SIN:13) ⁷⁰⁴ VS ^{NYVDWWE} ₇₁₃ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
1F3 Группы IA	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁹ TTVI (SIN:9) ⁵⁴⁴ DFNIQNYNHDIALVQ ⁵⁵⁸ (SIN:11) ⁶³⁹ GNYSVTENMFC ⁶⁴⁹ (SIN:13) ⁷⁰⁴ VS ^{NYVDWWE} ₇₁₃ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
4B6 Группы IA	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁹ TTVI (SIN:9) ⁵⁴⁴ DFNIQNYNHDIALVQ ⁵⁵⁸ (SIN:11) ⁶³⁹ GNYSVTENMFC ⁶⁴⁹ (SIN:13) ⁷⁰⁴ VS ^{NYVDWWE} ₇₁₃ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
1A10 Группы IA	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁹ TTVI (SIN:9) ⁵⁴⁴ DFNIQNYNHDIALVQ ⁵⁵⁸ (SIN:11) ⁶³⁹ GNYSVTENMFC ⁶⁴⁹ (SIN:13) ⁷⁰⁴ VS ^{NYVDWWE} ₇₁₃ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
10D12 Группы IB	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁹ TTVI (SIN:9)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
13B1 Группы IC	⁴⁹⁴ TAAHVLRSQRRD ⁵⁰⁸ TTV (SIN:10) ⁶²⁶ PHAECKTSYESRS ⁶³⁸ (SIN:12)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует
Коровая последовательность Группы I	⁴⁹⁸ VLRSQRRD ⁵⁰⁸ TTV (SIN:15)		
1G4 Группы II конкурирует за перекрестное связывание с	⁴⁵⁴ RNAEPGLFPWQ ⁴⁶⁴ (SIN:17) ⁵¹⁴ EHVT ^{NYLGLH} ₅₂₃ (SIN:19) ⁶⁶⁷ AFVIFD ^{DL} ₆₇₈ Q ^{SRW} (SIN:23)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ингибирует

Группами I и III			
1E7 Группы IIIA	454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17) 514EHVTVYLGLH ₅₂₃ (SIN:19) 667AFVIFDDLSQRW ₆₇₈ (SIN:23)	1G4	Слабо ингибирует
2D7 Группы IIIA	454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17) 514EHVTVYLGLH ₅₂₃ (SIN:19) 667AFVIFDDLSQRW ₆₇₈ (SIN:23)		Слабо ингибирует
2F5 Группы IIIB	454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17) 479KWFGSGALLSASWIL ₄₉₃ (SIN 18) 562PVPLGPHVMP ₅₇₁ (SIN:20) 667AFVIFDDLSQRW ₆₇₈ (SIN:23)		Нет эффекта
15D9 Группы IIIB	454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17) 479KWFGSGALLSASWIL ₄₉₃ (SIN 18) 562PVPLGPHVMP ₅₇₁ (SIN:20) 667AFVIFDDLSQRW ₆₇₈ (SIN:23)		Нет эффекта
1B11 Группы IIIC	435ECGQPSRSLPSLV ₄₄₇ (SIN:16) 454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17) 583APHMLGL ₅₈₉ (SIN:21) 614SDVLQYVKLP ₆₂₃ (SIN:22)		стимулирует
Коровья последовательность Группы II и Группы III	454RNAEPGLFPWQ ₄₆₄ (SIN:17)		
2F2 Группы IV	Связывание с эпитопом не определяли	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	стимулирует
11B6 Группы IV	Связывание с эпитопом не определяли	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	Нет эффекта

На фиг. 62 схематически представлена диаграмма, иллюстрирующая области контактирования человеческого MASP-3 с анти-MASP-3 mAb, определенные с помощью анализа Pepscan. Как показано на фиг. 62, все анти-MASP-3 mAb имеют области контактирования в бета-цепи, содержащей домен SP MASP-3. Одно mAb, 1B11, также имеет область контактирования между CCP2 и доменами SP в альфа-цепи MASP-3.

На фиг. 63A-67 показаны 3-D-модели, иллюстрирующие области контактирования высокоаффинных анти-MASP-3 mAb на доменах CCP1/2/SP человеческого MASP-3, где активный центр домена SP MASP-3 находится впереди, а каталитическая триада показана как боковые цепи.

На фиг. 63A представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb 1F3, 4D5 и 1A10, включающими аминокислотные остатки 498-509 (SEQ ID NO: 9), аминокислотные остатки 544-558 (SEQ ID NO: 11), аминокислотные остатки 639-649 (SEQ ID NO: 13) и аминокислотные остатки 704-713 (SEQ ID NO: 14).

На фиг. 63B представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 10D12, включающим аминокислотные остатки 498-509 (SEQ ID NO: 9).

На фиг. 64 представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 13B1, включающим аминокислотные остатки 494-508 (SEQ ID NO: 10) и аминокислотные остатки 626-638 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 65 представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинным анти-MASP-3 mAb 1B11, включающим аминокислотные остатки 435-447 (SEQ ID NO: 16), аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 583-589 (SEQ ID NO: 21) и аминокислотные остатки 614-623 (SEQ ID NO: 22).

На фиг. 66 представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными анти-MASP-3 mAb 1E7, 1G4 и 2D7, включающими аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 514-523 (SEQ ID NO: 19) и аминокислотные остатки 667-678 (SEQ ID NO: 23).

На фиг. 67 представлены области контактирования человеческого MASP-3 с высокоаффинными ан-

ти-MASP-3 mAb 15D9 и 2F5, включающими аминокислотные остатки 454-464 (SEQ ID NO: 17), аминокислотные остатки 479-493 (SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 562-571 (SEQ ID NO: 20) и аминокислотные остатки 667-678 (SEQ ID NO: 23).

В целом, были оценены конечные профили связывания для 12 из 14 антител. Все 12 картированных антител распознавали доступные для растворителя эпитопы в домене пептидазы S1. Тесная близость ряда эпитопов-детерминант к остаткам каталитической триады активного центра (H497, D553, S664) соответствуют модели, в которой высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb блокируют ферментативную активность посредством подавления взаимодействия фермента с субстратом.

Пример 19.

В этом примере описана гуманизация репрезентативных анти-MASP-3 mAb и конструирование потенциальных сайтов посттрансляционной модификации.

Методы.

1. Гуманизация репрезентативных высокоаффинных анти-MASP-3 mAb.

Методы.

Для снижения риска иммуногенности репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела 4D5, 10D12 и 13B1 были гуманизированы методом присоединения CDR. CDR каждого анти-MASP-3 антитела присоединяли к наиболее консенсусным человеческим каркасным последовательностям. Некоторые остатки зоны Верньера были модифицированы посредством сайт-направленного мутагенеза Quickchange (Agilent Technologies). Полученные гуманизированные VH- и VL-области переносили в экспрессионные конструкции человеческих IgG1 или IgG4 и IgK на основе pcDNA3.1, и рекомбинантные антитела экспрессировали и очищали как описано выше. Аффинность гуманизированных антител определяли с помощью ELISA с использованием одновалентных Fab-фрагментов, и оценивали активность с помощью анализа на осаждение C3 с использованием интактных IgG4.

Результаты.

Аминокислотные последовательности репрезентативных гуманизированных вариантов переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи mAb 4D5, 10D12 и 13B1 представлены ниже. CDR (по Кэбату) подчеркнуты

4D5:

h4D5_VH-14 (SEQ ID NO:248)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRDDRTK

YNDKFKDKATLTVDTSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSLEDTYWGQGLTVTVSS

h4D5_VH-19 (SEQ ID NO:249)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRDDRTK

YNDKFKDRATLTVDTSNTAYMELSSLRSEDVAVYYCSSLEDTYWGQGLVTVSS
h4D5_VL-1 (SEQ ID NO:250)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR
10D12:
h10D12_VH-45 (SEQ ID NO:251)
 QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPT
YADDFKGRFVFLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAVYFCARGGEAMDYWGQGLVTVSS
h10D12_VH-49 (SEQ ID NO:252)
 QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPT
YADDFKGRFVFLDTSVRTPYLQISSLKAEDTATYFCARGGEAMDYWGQGLVTVSS
h10D12_VL-21 (SEQ ID NO:253)
 DVLMQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKL
DSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPWTFGQGTKVEIKR
13B1
h13B1_VH-9 (SEQ ID NO:254)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGTGSTN
YAKQFQGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRSEDVWGQGLVTVSS
h13B1_VH-10 (SEQ ID NO:255)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGTGSTN
YNEKFKGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRSEDVWGQGLVTVSS
h13B1_VL-1 (SEQ ID NO:256)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

Аффинность репрезентативных гуманизированных антител 4D5, 10D12 и 13B1 против человеческого MASP-3 представлена ниже в табл. 29.

Таблица 29. Связывание репрезентативных гуманизированных анти-MASP-3 mAb с MASP-3

Клон анти-MASP-3 антитела (в формате Fab)	Связывание с человеческим MASP-3, EC ₅₀ (нМ)
4D5, родительский Fab	0,107
h4D5_14-1 Fab (VH-14 и VL-1)	0,085
h4D5_19-1 Fab (VH-19 и VL-1)	0,079
10D12, родительский Fab	0,108
h10D12_45-21 Fab (VH-45 и VL-21)	0,108
h10D12_49-21 Fab (VH-49 и VL-21)	0,115
13B1 родительский Fab	0,123
h13B1_9-1 Fab (VH-9 и VL-1)	0,101
h13B1_10-1 Fab (VH-10 и VL-1)	0,097

Процент идентичности гуманизированных каркасных последовательностей и человеческих каркасных последовательностей зародышевой линии:

h4D5_VH-14=90%; h4D5_VH-19=91%; h4D5_VL-1=100%;

h10D12_VH-45=92%; h10D12_VH-49=91%; h10D12_VL-21=93%;

h13B1_VH-9=95%; h13B1_VH-10=94%; h13B1_VL-1=100%.

2. Мутагенез репрезентативных анти-MASP-3 mAb для удаления сайтов модификации Asn/Asp в CDR-1 вариабельной области легкой цепи 4D5, 10D12 и 13B1.

Репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb 4D5, 10D12 и 13B1 анализировали на посттрансляционную модификацию. Аспарагиновые остатки, за которыми следуют глицин, серин, гистидин, аланин или аспарагин (мотив "NG", "NS", "NH", "NA" или "NN"), часто являются восприимчивыми к гидролизу амидной группы боковой цепи аспарагина или к "дезамидированию". Остатки аспарагиновой кислоты, за которыми следуют глицин или пролин (мотив "DG" или "DP"), часто являются восприимчивыми к взаимному превращению или к "изомеризации". Такие модификации изменяют заряд и могут влиять на функцию антитела, если они присутствуют в пограничной связывающей области. Они могут также повышать риск фрагментации, иммуногенности и агрегации.

Потенциальные мотивы посттрансляционной модификации были идентифицированы в CDR-1 вариабельных областей легкой цепи 4D5, 10D12 и 13B1.

4D5 и 13B1 содержали один возможный сайт дезамидирования Asn в CDR1 легкой цепи (показанный как "NS" в положениях 8 и 9 SEQ ID NO: 142, который подчеркнут ниже в табл. 30). Как также показано ниже в таблице 30, 10D12 содержало один возможный сайт изомеризации Asp в CDR1 легкой цепи.

Варианты этих гуманизированных анти-MASP-3 mAb были получены посредством сайт-направленного мутагенеза, как показано в табл. 30. Эти варианты экспрессировали и очищали как описано выше. Аффинность определяли с помощью ELISA с использованием одновалентных Fab-фрагментов и оценивали активность с помощью анализа на осаждение C3 с использованием интактных IgG4, описанных выше.

Таблица 30. Вариант CDR-L1 для 4D5, 10D12 и 13B1

Антитело	Область	Последовательность
Родительское 4D5	LC-CDR1	KSSQSLL <u>NS</u> RTKKNYLA (SEQ ID NO:142)
Мутантное 4D5-NQ	LC-CDR1	KSSQSLL <u>Q</u> SRTKKNYLA (SEQ ID NO:257)
Мутантное 4D5-NA	LC-CDR1	KSSQSLL <u>A</u> SRTKKNYLA (SEQ ID NO:258)
Мутантное 4D5-ST	LC-CDR1	KSSQSLL <u>N</u> TRTKKNYLA (SEQ ID NO:259)
Родительское 13B1	LC-CDR1	KSSQSLL <u>NS</u> RTKKNYLA (SEQ ID NO:142)
13B1-NQ	LC-CDR1	KSSQSLL <u>Q</u> SRTKKNYLA (SEQ ID NO:257)
13B1-NA	LC-CDR1	KSSQSLL <u>A</u> SRTKKNYLA (SEQ ID NO:258)
13B1-ST	LC-CDR1	KSSQSLL <u>N</u> TRTKKNYLA (SEQ ID NO:259)
Консенсусная последовательность для 4D5, 13B1 и вариантов	LC-CDR1	KSSQSLLXXRTKKNYLA (SEQ ID NO:260) где X в положении 8 представляет собой N, Q или A; и где X в положении 9 представляет собой S или T
Родительское 10D12	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
Мутантное 10D12-DE	LC-CDR1	KSSQSLLDSE <u>G</u> KTYLN (SEQ ID NO:261)
Мутантное 10D12-DA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDA <u>G</u> KTYLN (SEQ ID NO:262)
Мутантное 10D12-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDA <u>K</u> TYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Консенсусная последовательность для 10D12, 35C1 и вариантов	LC-CDR1	KSSQSLLDSXXKTYLX (SEQ ID NO:215), где X в положении 10 представляет собой D, E или A; где X в положении 11 представляет собой G или A; и где X в положении 16 представляет собой N или S

Таблица 31. Связывание мутагенных кандидатов на гуманизированные mAb 4D5, 10D12 и 13B1 с человеческим MASP-3

Клон анти-MASP-3 антитела (в формате Fab)	Связывание с человеческим MASP-3, EC ₅₀ (пМ)
h4D5_19-1, родительский Fab (VH-19 и VL-1)	102
h4D5-19-1-NQ Fab (VH-19 и VL-1-NQ)	732
h4D5-19-1-NA Fab (VH-19 и VL-1-NA)	122
h4D5-19-1-ST Fab (VH-19 и VL-1-ST)	151
h10D12_45-21, родительский Fab (VH-45 и VL-21)	108
h10D12-45-21-DE Fab (VH-45 и VL-21-DE)	326
h10D12-45-21-DA Fab (VH-45 и VL-21-DA)	294
h10D12-45-21-GA Fab (VH-45 и VL-21-GA)	181
h13B1_10-1, родительский Fab (VH-10 и VL-1)	100
h13B1_10-1-NQ Fab (VH-10 и VL-1-NQ)	138
h13B1_10-1-NA Fab (VH-10 и VL-1-NA)	105
h13B1_10-1-ST Fab (VH-10 и VL-1-ST)	120

Таблица 32. Гуманизированные последовательности VH анти-MASP-3 антитела (области CDR и FR, по Кэбату)

Антитело	HC FR1	HC CDR1
Родительское	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT	TDDIN

4D5 (SIN:24)	(SEQ ID NO:55)	(SEQ ID NO:56)
h4D5_VH-14 (SIN:248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
h4D5_VH-19 (SIN:249)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
Родительское 10D12 (SIN:28)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12_VH-45 (SIN:251)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12-VH-49 (SIN:252)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
Родительское 13B1 (SIN:30)	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_VH-9 (SIN:254)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_VH-10 (SIN:255)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
Антитело	HC FR2	HC CDR2
Родительское 4D5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH-14	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH-19	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
Родительское 10D12	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12_VH-45	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12-VH-49	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
Родительское 13B1	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
h13B1_VH-9	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYAQKFQG (SEQ ID NO:275)

h13B1_VH-10	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
Антитело	HC FR3	HC CDR3
Родительское 4D5	<u>K</u> ATLTVDTSNTAYMDL <u>H</u> SLT <u>S</u> ED <u>S</u> AVYFCSS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
h4D5_VH-14	KATLTVDTSNTAYMELSSLRSEDТАVYYCSS (SEQ ID NO:266)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
h4D5_VH-19	<u>R</u> ATLTVDTSNTAYMELSSLRSEDТАVYYCSS (SEQ ID NO:267)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
Родительское 10D12	RF <u>A</u> FSLETS <u>A</u> RTPYLQINNLK <u>N</u> EDT <u>A</u> TYFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12_VH-45	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDТАVYFCAR (SEQ ID NO:270)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12-VH-49	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDT <u>A</u> TYFCAR (SEQ ID NO:271)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
Родительское 13B1	<u>K</u> ATFTADSSNTAYMQLLSSLT <u>T</u> ED <u>S</u> AMYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_VH-9	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_VH-10	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
Антитело	HC FR4	
Родительское 4D5	WGQGTLV <u>A</u> VSS (SEQ ID NO:61)	
h4D5_VH-14	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
h4D5_VH-19	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
Родительское 10D12	WGQGT <u>S</u> TVTVSS (SEQ ID NO:77)	
h10D12_VH-45	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
h10D12-VH-49	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
Родительское	WG <u>T</u> GTTTVTVSS	
13B1	(SEQ ID NO:89)	
h13B1_VH-9	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	
h13B1_VH-10	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	

Репрезентативные гуманизированные переменные области легкой цепи с вариантами

h4D5_VL-1-NA (SEQ ID NO:278)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR

h10D12_VL-21-GA (SEQ ID NO:279)

DVLMQTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDAKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKL
DSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPWTFGQGTKVEIKR

h13B1_VL-1-NA (SEQ ID NO:280)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

Таблица 33. Гуманизованные последовательности VL анти-MASP-3 антитела
(области CDR и FR, по Кэбату) [плюс варианты в LC-CDR1]

Антитело	LC FR1	LC CDR1
Родительское 4D5 (SIN:40)	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTMTTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1 (SIN:250)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1-NA (SIN:278)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
Родительское 10D12 (SIN:43)	DVLMQTQPLTSLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21 (SIN:253)	DVLMQTQPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21- GA (SIN:279)	DVLMQTQPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
Родительское 13B1	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h13B1_VL-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)

h13B1_VL-1-NA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
Антитело	LC FR2	LC CDR2
Родительское 4D5	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h4D5_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h4D5_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Родительское 10D12	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21- GA	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
Родительское 13B1	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Антитело	LC FR3	LC CDR3
Родительское 4D5	GVPDRFTGSGSGTD F SLTIS S VQAED L AVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS S LQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS S LQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
Родительское 10D12	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAED L GVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGFHFPWT (SEQ ID NO:157)
h10D12_VL-21	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG V YYC (SEQ ID NO:286)	WQGFHFPWT (SEQ ID NO:157)
h10D12_VL-21- GA	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG V YYC (SEQ ID NO:286)	WQGFHFPWT (SEQ ID NO:157)
Родительское	GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS S VQAED L AVYYC	KQSYNIPT

13B1	(SEQ ID NO:150)	(SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
Антитело	LC FR4	
Родительское 4D5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h4D5_VL-1	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:284)	
h4D5_VL-1-NA	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:284)	
Родительское 10D12	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h10D12_VL-21	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:287)	
h10D12_VL-21- GA	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:287)	
Родительское 13B1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h13B1_VL-1	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:284)	
h13B1_VL-1-NA	FGQGTVKEIKR (SEQ ID NO:284)	

Пример 20.

Анализ репрезентативного MASP-3-ингибирующего mAb 13B1 у мышей с моделью рассеянного склероза.

Предпосылки/Обоснование. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), т.е. приобретенное воспалительное и демиелинизирующее аутоиммунное расстройство представляет собой созданную у животного модель рассеянного склероза (РС). Имеются данные, которые позволяют предположить, что APC играет значительную роль в развитии/прогрессировании ЭАЭ, и что такое заболевание ослабляется у мышей, обработанных антителом, нейтрализующим фактор В (Hu et al., Mol. Immunol. 54:302, 2013). В этом примере описан анализ репрезентативного высокоаффинного MASP-3-ингибирующего антитела 13B1, у модели ЭАЭ.

Методы.

Индукция ЭАЭ.

Для индукции ЭАЭ в этом исследовании был использован набор, закупленный у Hooke Laboratories (Lawrence, MA). Этот набор содержал нейроантиген MOG₃₅₋₅₅ в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), а также коклюшный токсин.

В этом исследовании использовали 30 самок мышей дикого типа C57 B1/6J и этих мышей оставляли для акклиматизации к соответствующим условиям содержания в течение по меньшей мере одной недели до индукции ЭАЭ. Возраст мышей на время индукции составлял приблизительно 10 недель. Как показано ниже в табл. 34, при индукции, каждой мыши подкожно (sc) вводили две 100 мкл-инъекции MOG₃₅₋₅₅ и одну внутрибрюшинную (ip) инъекцию 100 мкл (400 нг) коклюшного токсина. Вторую инъекцию коклюшного токсина вводили через 24 часа после первой инъекции.

Обработка: 30 мышей были разделены на три группы по 10 животных и обработаны иррелевантным mAb контрольного изотипа (10 мг/кг i.v.); mAb 13B1 (анти-MASP-3 антителом, 10 мг/кг i.v.) или mAb 1379 (антителом против фактора В (Hu et al., Mol. Immunol. 54:302, 2013) 40 мг/кг i.p.). Как показано в табл. 34, дозу mAb контрольного изотипа и анти-MASP-3 mAb 13B1 вводили еженедельно, начиная со дня -16 и до дня +12. Дозу mAb 1379 вводили через день со дня +3 до дня +11, в соответствии со схемой введения доз, описанной Hu et al., Mol. Immunol. 54:302-308, (2013).

Таблица 34. Экспериментальные методы для проведения исследования ЭАЭ с использованием анти-MASP-3 mAb 13B1

День введения	Коклюшный токсин 400 нг i.p.	Пептид MOG 35-55 250 мкг	mAb 1379 (против фактора В) 40 мг i.p.	mAb контрольного изотипа 10 мг/кг i.v.	mAb 13B1 (против MASP-3) 10 мг/кг i.v.
-16				+	+
-9				+	+
-2				+	+
0	+	+			
+1	+				
+3			+		
+5			+	+	+
+7			+		
+9			+		
+11			+		
+12				+	+

Оценка. Мышей оценивали через день до появления симптомов, после чего их оценивали ежедневно. Первые признаки заболевания, как и ожидалось, наблюдались через 7-12 дней после иммунизации. Мышей оценивали по баллам оценочной шкалы, представленной ниже в табл. 35.

Таблица 35. Критерии оценок у модели ЭАЭ

Балл	Клинические наблюдения
0,0	У мышей не наблюдалось какого-либо изменения двигательных функций по сравнению с неиммунизованными мышами. При подъеме хвоста у основания наблюдается напряжение и вытягивание. Задние конечности обычно раздвинуты. При передвижении мыши не наблюдается изменения походки или наклона головы.
0,5	Повисание кончика хвоста. При подъеме хвоста у основания наблюдается напряжение, за исключением кончика хвоста. Наблюдается напряженность мышц хвоста, но при этом, хвост продолжает двигаться.
1,0	Повисание хвоста. При подъеме хвоста у основания, вместо вытягивания, весь хвост свешивается на пальцы. Задние конечности обычно раздвинуты. Каких-либо признаков движения хвоста не наблюдалось.
1,5	Повисание хвоста и торможение задних конечностей. При подъеме хвоста у основания весь хвост свешивается на пальцы. При опускании мыши на навесную решетку, по меньшей мере одна задняя лапа полностью опускается. Походка становится очень нетвердой.
2,0	Повисание хвоста и слабость задних конечностей. При подъеме хвоста у основания, задние лапы не раздвигаются и располагаются рядом друг с другом. При наблюдении передвижения мышей, походка была явно нетвердой. Пальцы одной лапы двигались с трудом, а пальцы другой лапы почти не двигались;

	ИЛИ Мышам была поставлена оценка 0,0, но наблюдались явные признаки наклона головы при ходьбе. Равновесие было нарушено.
2,5	Хвост повисал и задние лапы двигались с трудом. Обе задних лапы немного двигались, но все же они двигались с трудом (мышь передвигалась на задних лапах). - ИЛИ- наблюдалось движения одной лапы/одна лапа двигалась с трудом, но другая лапа двигалась нормально - ИЛИ - Тяжесть ЭАЭ оценивалась как слабая при поеме хвоста (по оценке 0,0-1,5), но наблюдался сильный наклон головы, а поэтому мышь иногда падала.
3,0	Наблюдалось повисание хвоста и полный паралич задних лап (наиболее частые симптомы). - ИЛИ - Повисание хвоста и почти полный паралич задних лап. Одна или обе задних лапы могли передвигаться, ковыляя, но ни одна задняя лапа не могла становиться впереди заднего бедра - ИЛИ - Наблюдалось повисание хвоста и паралич одной передней и одной задней лапы - ИЛИ - ВСЕ признаки: сильный наклон головы, передвижение только по краям клетки, отталкивание от стенок клетки и переворачивание при подъеме основания хвоста.
3,5	Наблюдалось повисание хвоста и полный паралич задних лап. Помимо этого: мышь передвигалась по клетке, но при ее помещении на бок, она не могла самостоятельно встать. Задние лапы находились вместе, но на одной стороне туловища - ИЛИ - мышь передвигалась по клетке, но задняя часть туловища была плоской подобно блину, что создавало впечатление, что у мыши имеется горб в передней части туловища.
4,0	Наблюдалось повисание хвоста, полный паралич задних лап и частичный паралич передних лап. Мышь совершала минимальные движения по клетке, но в случае тревоги и подаче корма. Если мышам был поставлен балл 4,0 в течение 2 дней, то чаще всего рекомендуется эвтаназия. Однако, при ежедневном подкожном введении жидкости, у некоторых мышей балл мог составлять 3,5 или 3,0. Если мышь подвергали эвтаназии из-за тяжелого паралича, то в остальном эксперименте, мыши присваивали балл 5,0.
4,5	Наблюдался полный паралич задних лап и частичный паралич передних лап, а также не наблюдалось перемещения по клетке. Мышь не проявляла признаков тревоги. У мыши наблюдались минимальные движения передних лап. Мышь почти не реагировала на прикосновение. В таком случае рекомендуется эвтаназия. Если
	мышь подвергали эвтаназии из-за тяжелого паралича, то в остальном эксперименте, мыши присваивали балл 5,0.
5,0	Мышь спонтанно перекачивалась по клетке.

Результаты.

На фиг. 68 графически проиллюстрированы результаты анализа на модели ЭАЭ у мышей, обработанных либо MASP-3-ингибирующим mAb 13B1 (10 мг/кг), либо mAb против фактора В 1379 (40 мг/кг), либо mAb контрольного изотипа (10 мг/кг), где положение стрелок вниз указывает на дозу антитела против фактора В, а положение стрелок вверх указывает на последнюю дозу mAb 13B1. Как показано на фиг. 68, у мышей, обработанных MASP-3-ингибирующим mAb 13B1 и mAb против фактора В 1379, наблюдалось ослабление клинических симптомов, оцененных в соответствии с параметрами, представленными в табл. 35, по сравнению с обработкой антителом контрольного изотипа.

В соответствии с вышесказанным, предполагается, что MASP-3-ингибирующие антитела, такие как высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, описанные в настоящей заявке, будут давать благо-

приятный эффект (нейропротективный или нейрорегенеративный) при лечении и/или реабилитации индивидуума, страдающего рассеянным склерозом, концентрическим склерозом Бало, нейромиелиом зрительного нерва, рассеянным склерозом Марбурга, болезнью Шильдера, рассеянным склерозом, вызывающим отеки и острым диссеминированным энцефаломиелиом (ОДЭ).

Пример 21. Фармакодинамическое исследование с использованием репрезентативных высокоаффинных анти-MASP-3 mAb у собакоподобных обезьян.

Предпосылки/Обоснование. Как было продемонстрировано в исследованиях на грызунах (фиг. 44), высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело обладало способностью к устойчивому ингибированию (остаточному) созревания про-фактора D *in vivo*. В этом примере описано исследование, которое было проведено на собакоподобных обезьянах для того, чтобы определить, могут ли репрезентативные высокоаффинные MASP-3-ингибирующие mAb ингибировать активность APC у примата, не являющегося человеком.

Методы. Для подтверждения того, что MASP-3 функционирует в APC у примата, не являющегося человеком, и что высокоаффинные анти-MASP-3 антитела способны ингибировать APC у примата, не являющегося человеком, 9 собакоподобным обезьянам (3 животным на mAb-статус) вводили одну внутривенную 5 мг/кг-дозу одного из трех репрезентативных высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител: h4D5X, h10D12X или h13B1X. ("h" означает гуманизированное, "X" константную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 312), содержащую стабилизирующую аминокислотную замену S228P и человеческую константную область IgG4 с мутацией S228P, а также с мутацией, которая стимулирует взаимодействия FcRn при низком pH). Пробы плазмы (EDTA) и сыворотки собирали через регулярные промежутки времени в течение трех недель или более.

Было проведено два анализа для оценки активности APC в сыворотке, взятой у обработанных обезьян. В первом анализе оценивали уровни фактора Bb комплемента, осажденного на сферах зимозана, добавленных в разведенную сыворотку. Во втором анализе оценивали уровни жидкофазных продуктов активированного зимозаном APC, т.е. факторов Ba и Bb комплемента, а также C3a.

Для детектирования фактора Bb, осажденного на зимозане, был проведен проточный цитометрический анализ с использованием антитела против фактора Bb A252 (Quidel). Для определения фонового сигнала в анализе после полного ингибирования APC, в аликвоту сыворотки (в конечном объеме 5%, разведенную в GVB+Mg/EGTA), полученную от собакоподобных обезьян, обработанных анти-MASP-3 mAb, добавляли 300 нМ антитела, ингибирующего фактор D. Для определения степени ингибирования APC посредством анти-MASP-3 mAb, введенного обезьянам внутривенно, во вторую аликвоту разведенной сыворотки добавляли 300 нМ нейтрального антитела контрольного изотипа (не обладающего APC-ингибирующей активностью), а затем оценивали степень осаждения фактора Bb на зимозане. Смеси антитела-сыворотки инкубировали в течение 30 мин на льду, а затем добавляли зимозан (в конечной концентрации 0,1 мг/мл). Смеси инкубировали при 37°C в течение 65 мин, и активность APC измеряли на проточном цитометре путем детектирования фактора Bb комплемента (антитела A252, Quidel) на поверхности частиц зимозана.

Для оценки продуцирования жидкофазных маркеров Ba, Bb и C3a, APC индуцировали в анализах *ex vivo* путем инкубирования зимозана (в конечной концентрации 1 мг/мл) в сыворотке (в конечном объеме 5%, разведенной в GVB+Mg/EGTA), полученной от собакоподобных обезьян, обработанных анти-MASP-3 mAb. Смеси инкубировали при 37°C в течение 40 мин, и активность APC измеряли путем детектирования конечных точек комплемента с помощью ELISA. Ba, Bb и C3a детектировали в супернатантах реакционной смеси с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA (Quidel). Величины оптической плотности во всех анализах нормализовали путем принятия величин до обработки за 100% активность, а величину перед обработкой пробы, которая была инкубирована, но не обработана зимозаном, принимали за 0%.

Для установления взаимосвязи между степенью ингибирования APC и отношением "антитело - мишень" у обезьян, обработанных анти-MASP-3 mAb, определяли уровни MASP-3 и MASP-3-ингибирующего mAb в сыворотке. Уровни MASP-3 в сыворотке оценивали с помощью "сэндвич"-ELISA-анализа. Белок MASP-3 захватывали на планшете посредством α M3-259 (как описано в примере 16). Пробы сыворотки (разведенные 1:40) сначала инкубировали с немеченным (небиотинилированным) анти-MASP-3 mAb, соответствующим лечебному mAb, при 37°C в течение 1 ч, а затем разводили 1:250 (в конечном объеме 1:10000), добавляли в планшет и инкубировали при 37°C в течение еще одного часа. Планшет промывали и в качестве детектирующего антитела использовали биотинилированный вариант mAb 10D12. Перед проведением стадии детектирования использовали крупное разведение сыворотки для разделения мишени и лечебного mAb, и для предотвращения конкурентного связывания лечебного антитела и детектирующего антитела. После многократной промывки планшета использовали стрептавидин-ПХ для проведения конечной стадии детектирования. Величины оптической плотности получали на планшет-ридере на длине волны 450 нм. Концентрации MASP-3 в сыворотке экстраполировали по стандартной кривой, построенной по данным анализа на рекомбинантный полноразмерный белок MASP-3 собакоподобных обезьян. Количество анти-MASP-3 антитела, присутствующего в сыворотке, детектировали с использованием набора для ELISA-анализа на человеческий терапевтический IgG4 (Cayman

Chemicals) в соответствии с инструкциями производителей.

Вестерн-блот-анализ был проведен для оценки уровня про-фактора D и фактора D в сыворотке собакоподобных обезьян в течение определенного периода времени (часы) после обработки одной внутривенной 5 мг/кг-дозой mAb h13B1X. Вкратце, вестерн-блот-анализ проводили путем смешивания 20 мкл плазмы собакоподобных обезьян, полученной в различные периоды времени до обработки (-120 часов, -24 часа) и после обработки (72, 168, 336, 504, 672 и 840 ч) PBS, и 11,2 мкл анти-CFD антитела (0,5 мкг/мкл) в общем объеме 400 мкл при 4°C в течение 1 ч. Затем добавляли 12 мкл белка A/G плюс агароза (Santa Cruz Biotech) и смесь инкубировали в течение ночи при 4°C. Иммунопреципитаты собирали путем центрифугирования при 1000× g в течение 5 мин при 4°C. Осадок пять раз промывали PBS. После конечной промывки осадок ресуспендировали в 30 мкл 1 × буфера для денатурации гликопротеина и гликопротеин денатурировали путем нагревания реакционной смеси при 100°C в течение 10 мин. В каждую пробирку добавляли 10× реакционный буфер G2, 10% NP-40 и 2,5 мкл пептид-N-гликозидазы (New England Biolabs, P0704L) и реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Агарозные сферы осаждали путем центрифугирования при 1000× g в течение 5 мин и 20 мкл супернатанта собирали в новые пробирки. Захваченные и дегликозилированные белки разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ (в 12% бис-трис-минигеле NuPAGE) и эти гели подвергали электроблоттингу для проведения вестерн-блот-анализа с использованием биотинилированного анти-CFD антитела (R&D Systems BAF1824) и стрептавидина-ПХ, обладающего высокой чувствительностью Pierce™ (Thermo Fischer Scientific 21130).

Результаты.

На фиг. 69 графически проиллюстрирована активность APC в пробах сыворотки, взятых у группы из трех собакоподобных обезьян в течение определенного периода времени после одной обработки на время 0 высокоаффинным анти-MASP-3 mAb h13B1X. На этой фигуре показана средняя MFI в проточном цитометрическом анализе для детектирования фактора Bb комплемента на поверхности частиц зимозана в 5% сыворотке, в которую были добавлены либо APC-ингибирующее mAb против фактора D, либо нейтральное mAb контрольного изотипа. Как показано на фиг. 69, у этих животных наблюдалось снижение активности APC уже через 4 ч. Если обработка анти-MASP-3 антителом блокировала APC также эффективно, как и ингибирование фактора D, то при двух условиях разведения антитела наблюдались идентичные уровни ингибирования осаждения Bb в пробах после введения дозы, но не до введения дозы (или время=0; фиг. 69). Как показано на фиг. 69, через 72 ч после обработки активность APC снижалась приблизительно до уровня, который был достигнут путем добавления mAb против фактора D в пробы сыворотки. Почти полное ингибирование, обусловленное обработкой антителом h13B1X, как было экспериментально определено путем сравнения ингибирования, достигаемого путем обработки антителом против фактора D, продолжалось вплоть до 336 ч (14 дней) после введения дозы. Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что обработка высокоаффинным MASP-3-ингибирующим mAb приводит к полному длительному ингибированию APC у примата, не являющегося человеком.

На фиг. 70 графически проиллюстрирована активность APC, определенная по осаждению Bb на зимозане, в пробах сыворотки, взятых у групп собакоподобных обезьян (3 животных на группу), обработанных одной внутривенной дозой 5 мг/кг высокоаффинных MASP-3-ингибирующих mAb h4D5X, h10D12X или h13B1X. Данные по осаждению Bb собирали, как описано выше. Активность APC на время обработки нормализовали путем принятия величин MFI до обработки проб неингибирующим антителом контрольного изотипа за 100% активность, а величину перед обработкой пробы, инкубированной с 50 mM EDTA (для ингибирования всей активности комплемента), принимали за 0%. Данные h13BX-обработки, используемые как показано на фиг. 70, также проиллюстрированы на фиг. 69. Как показано на фиг. 70, обработка всеми тремя высокоаффинными MASP-3-ингибирующими антителами давала более, чем 95% ингибирование APC. У h4D5X-, h10D12X- и h13B1X-обработанных животных сохранялось по меньшей мере 90% ингибирование APC в течение 6,7, 11,7 и 16 дней соответственно. Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что обработка этими репрезентативными высокоаффинными MASP-3-ингибирующими mAb приводит к длительному ингибированию APC у примата, не являющегося человеком, при введении одной дозы в 5 мг/кг.

На фиг. 71А-С графически проиллюстрированы дополнительные методы оценки активности APC. Жидкофазные Va (фиг. 71А), Bb (фиг. 71В) и C3a (фиг. 71С) оценивали в обработанных зимозаном и в разведенных пробах сыворотки, взятых у групп собакоподобных обезьян (3 животных на группу) в течение определенного периода времени после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг h4D5X, h10D12X и h13B1X как описано выше.

Как показано на фиг. 71А-С, одно введение всех трех высокоаффинных MASP-3-ингибирующих антител приводило к ингибированию APC, как было определено по трем конечным точкам для различных жидкофазных факторов. Эти данные соответствуют уровню ингибирования APC, продемонстрированного в исследовании по осаждению Bb на фиг. 70, а также указывают на эффективность этих mAb в ингибировании данного пути в течение нескольких недель.

На фиг. 72А-С графически проиллюстрирована взаимосвязь между активностью APC, определенной по продуцированию жидкофазного Va и молярным отношением мономерного MASP-3 и анти-

MAASP-3 антитела, детектируемого в сыворотке обезьян, обработанных либо h4D5X (фиг. 72A), либо h10D12X (фиг. 72B), либо h13B1X (фиг. 72C). Каждая панель на фиг. 72A-C соответствует данным для одной обезьяны. Обезьяны и сыворотка (или плазма), используемые в этом исследовании, являются такими же, как они были описаны выше (фиг. 69, 70 и 71).

На фиг. 72A-C графически проиллюстрировано молярное отношение мишени (MAASP-3) к высокоаффинным MAASP-3-ингибирующим антителам h4D5X (фиг. 72A), h10D12X (фиг. 72B) и h13B1X (фиг. 72C) в определенные периоды времени полного ингибирования APC, как было определено по жидкофазному Ва. Для сравнения, молярное отношение мишень:антитело=1:1 показано на каждом графике пунктирной линией. Как показано на фиг. 72A-C, молярное отношение "мишень (MAASP-3):высокоаффинные MAASP-3-ингибирующие mAb h4D5X, h10D12X и h13B1X", составляющее приблизительно от 2:1 до 2,5:1 (мишень:антитело), является достаточным для полного ингибирования APC. Эти данные продемонстрировали, что эти три репрезентативных MAASP-3-ингибирующих mAb являются активными высокоаффинными MAASP-3-ингибирующими антителами, которые способны ингибировать APC, если их молярные концентрации меньше, чем концентрация мишени. Эти уровни активности со всей очевидностью указывают на то, что такие mAb могут быть использованы в клинических целях для лечения заболеваний или расстройств, вызываемых APC.

На фиг. 73 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ для определения уровня про-фактора D и фактора D в сыворотке, взятой у собакоподобной обезьяны в течение определенного периода времени (часы) до обработки и после обработки одной внутривенной дозой 5 мг/кг mAb h13B1X. Как показано на фиг. 73, фактор D присутствует в плазме как про-фактор D по меньшей мере в течение 336 ч (14 дней) после введения одной дозы mAb h13B1X.

Краткое описание результатов.

Как описано в примере 11, введение мышам одной дозы высокоаффинного MAASP-3-ингибирующего антитела mAb 13B1 приводило к почти полной элиминации системной активности компонента альтернативного пути по меньшей мере через 14 дней. Как дополнительно описано в примере 12, в исследовании, проведенном на хорошо разработанной модели, ассоциированной с ПНГ у животного, было продемонстрировано, что mAb 13B1 значительно повышает жизнеспособность ПНГ-подобных эритроцитов и защищает ПНГ-подобные эритроциты значительно лучше, чем ингибирование C5. Как описано в примере 13, было также продемонстрировано, что mAb 13B1 снижает заболеваемость и тяжесть заболевания у мышей с моделью артрита. Результаты, описанные в этом примере, показали, что репрезентативные высокоаффинные MAASP-3-ингибирующие mAb 13B1, 10D12 и 4D5 являются в высокой степени эффективными для блокирования альтернативного пути у приматов. Введение одной дозы mAb 13B1, 10D12 или 4D5 собакоподобным обезьянам приводило к длительной элиминации системной активности альтернативного пути приблизительно в течение 16 дней. Степень элиминации альтернативного пути у собакоподобных обезьян, обработанных высокоаффинными MAASP-3-ингибирующими антителами, была сравнима со степенью элиминации, достигаемой при блокировании фактора D *in vitro*, что указывает на полное блокирование превращения фактора D под действием MAASP-3-ингибирующих антител. Следовательно, высокоаффинные MAASP-3-ингибирующие mAb обладают терапевтической эффективностью при лечении пациентов, страдающих заболеваниями, ассоциированными с гиперактивностью альтернативного пути, такими как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП, включая мокрую и сухую ВДЖП), ишемическо-реперфузионное повреждение, артрит, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, тромботическая микроангиопатия (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (АГУС), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) или ТМА, ассоциированную с трансплантацией), астма, болезнь плотных отложений, олигоиммунный некрозирующий серповидный гломерулонефрит, черепно-мозговая травма, аспирационная пневмония, эндофальмит, нейромиелит зрительного нерва, болезнь Бехчета, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (АБС), волчаночный нефрит, системная красная волчанка (СКВ), диабетическая ретинопатия, увеит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), С3-гломерулопатия, отторжение трансплантата, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализ, сепсис, синдром системного воспалительного ответа (ССВО), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), ANCA-вакулит, антифосфолипидный синдром, атеросклероз, IgA-нефропатия и тяжелая миастения.

VII. Другие варианты осуществления изобретения.

Все публикации, патентные заявки и патенты, описанные в настоящей заявке, вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Различные модификации и варианты описанных способов, композиций и соединений согласно изобретению будут очевидны для специалистов в данной области и не выходят за рамки существа и объема изобретения. Хотя настоящее изобретение описано на конкретных предпочтительных вариантах его осуществления, однако, следует отметить, что заявленное изобретение не должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления изобретения. Действительно, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые являются очевидными для специали-

стов в области медицины, иммунологии, фармакологии, онкологии или в родственных областях, входят в объем настоящего изобретения.

В соответствии с вышесказанным, настоящее изобретение представлено нижеследующими вариантами его осуществления.

Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP.

1А. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO: 2) с высокой аффинностью (имеющей K_D менее, чем 500 пМ), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют активацию комплемента альтернативного пути.

2А. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются по меньшей мере одним или более из нижеследующих свойств:

- (a) ингибируют созревание про-фактора D;
- (b) не связываются с человеческим MASP-1 (SEQ ID NO: 8);
- (c) ингибируют альтернативный путь в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb) у млекопитающего;
- (d) не ингибируют классический путь;
- (e) ингибируют гемолиз и/или опсонизацию;
- (f) ингибируют расщепление, специфичное к субстрату сериновой протеазы MASP-3;
- (g) снижают степень гемолиза или степень расщепления C3 и осаждения поверхностного C3b;
- (h) снижают степень осаждения фактора В и Bb на активирующей поверхности;
- (i) снижают остаточные уровни (в кровотоке и без экспериментальной дополнительной активации поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D;
- (j) снижают уровни активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активацию поверхности;
- (k) снижают уровни продуцирования остаточных и/или индуцированных на поверхности жидко-фазных Ba, Bb, C3b или C3a; и/или
- (l) снижают осаждение фактора Р.

3А. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, расположенным в домене сериновой протеазы человеческого MASP-3, где указанный эпитоп расположен по меньшей мере в одной или более из: VLRSQRDDTTVI (SEQ ID NO: 9), TAAHVLSQRDDTTV (SEQ ID NO: 10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO: 11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO: 12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO: 13), VSNYVDWVWE (SEQ ID NO: 14) и/или VLRSQRDDTTV (SEQ ID NO: 15) [группа I].

4А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 15 [включая все Ab группы I].

5А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 9. [10D12]

6А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 10. [13B1].

7А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 12. [13B1].

8А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 10 и/или SEQ ID NO: 12. [13B1].

9А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 9. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10].

10А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10].

11А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10].

12А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где указанное антитело связывается с эпитопом по меньшей мере в одной из ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO: 16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO: 17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID NO: 18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO: 20); APHMLGL (SEQ ID NO: 21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO: 22); и/или AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). [Группы II и III].

13А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 17. [все Ab группы II и III].

14А. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где указанное антитело или его ан-

тигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19) и/или AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). [1G4, 1E7, 2D7 15D9].

15A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 23. [1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5].

16A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 19 и/или SEQ ID NO: 23. [Ig4, 1E7, 2D7].

17A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и/или SEQ ID NO: 23. [15D9, 2F5].

18A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и/или SEQ ID NO: 23 [15D9, 2F5].

19A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 21 и/или SEQ ID NO: 22. [1B11].

20A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с эпитопом по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 21 и/или SEQ ID NO: 22 [1B11].

21A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

22A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

23A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, также включающие константную область иммуноглобулина.

24A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

25A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-24, где указанное антитело связывается с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ.

26A. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-25, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

27A. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1A-26A и фармацевтически приемлемый эксципиент.

A. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела группы IA, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP (4D5, 4B6, 1A10 плюс варианты 4D5) 1B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 209 (XXDIN, где X в положении 1 представляет собой S или T и где X в положении 2 представляет собой N или D); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, где X в положении 7 представляет собой G или D; X в положении 8 представляет собой S, T или R; X в положении 9 представляет собой I или T; X в положении 13 представляет собой E или D; X в положении 14 представляет собой K или E; и X в положении 16 представляет собой T или K); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 211 (XEDXY, где X в положении 1 представляет собой L или V и где X в положении 4 представляет собой T или S); и

(b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, где X в положении 8 представляет собой N, I, Q или A; где X в положении 9 представляет собой S или T; и где X в положении 17 представляет собой A или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 146 (KQSYNLYT).

2B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (a) содержит SEQ ID NO: 56 (TDDIN). [4D5 и варианты].

3B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (a) содержит SEQ ID NO: 62 (SNDIN). [1F3, 4B6 и 1A10].

4B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR2 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (a) содержит SEQ ID NO: 58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD) [4D5 и варианты].

5B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR2 вариабель-

ной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 63 (WIYPRDGSIKYNEKFTD). [1F3]

6B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR2 вариательной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 67 (WIYPRDGTTKYNEEFTD). [4B6].

7B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR2 вариательной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 69 (WIYPRDGTTKYNEKFTD). [1A10]

8B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 60 (LEDTY) [4D5 и варианты].

9B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 65 (VEDSY). [1F3, 4B6 и 1A10].

10B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 вариательной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKKNYLA); SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKKNYLA), SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKKNYLA); или SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKKNYLA). [4D5 и варианты].

11B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где LC-CDR1 вариательной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKKNYLA). [мутант 4D5 NA].

12B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 вариательной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 149 (KSSQSLLISRTRKKNYLS). [1F3 и 4B6].

13B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 56, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 58, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 60 и где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 или SEQ ID NO: 259; где LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 144 и где LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 146. [все 6 CDR 4D5 с вариантами в LC-CDR1].

14B. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 62, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 69, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 65 и где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 149, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 144 и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 146. [все 6 CDR 1F3, 4B6 и 1A10].

15B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

16B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

17B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, также включающие константную область иммуноглобулина.

18B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

19B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 250 или SEQ ID NO: 278 [родительские, гуманизированные и модифицированные варианты 4D5].

20B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 25 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 41 [1F3].

21B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 26 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 42 [4B6].

22B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 27 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 42 [1A10].

23B. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где указанное антите-

ло связывается с человеческим MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ.

2В. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

25В. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.1В-24В и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела группы 1В, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP (варианты 10D12, 35C1 и 10D12) 1С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 213 (SYGXX, где X в положении 4 представляет собой M или I и где X в положении 5 представляет собой S или T); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 74; и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 214 (GGXAXDY, где X в положении 3 представляет собой E или D и где X в положении 5 представляет собой M или L); и

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, где X в положении 10 представляет собой D, E или A; где X в положении 11 представляет собой G или A; и где X в положении 16 представляет собой N или S); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 155; и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 216 (WQGTHFPXT, где X в положении 8 представляет собой W или Y).

2С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 72 (SYGMS). [10D12 и варианты].

3С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 79 (SYGIT). [35C1].

4С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 76 (GGEAMDY). [10D12 и варианты].

5С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с (а) содержит SEQ ID NO: 82 (GGDALDY). [35C1].

6С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 вариабельной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 153 (KSSQSLLDSDGKTYLN); SEQ ID NO: 261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), SEQ ID NO: 262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) или SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSADKTYLN). [10D12 и варианты].

7С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSDAKTYLN) [вариант 10D12 GA].

8С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 152. [35C1].

9С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 159 (KSSQSLLDSDGKTYLS). [10D12].

10С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи в соответствии с (b) содержит SEQ ID NO: 160 (WQGTHFPYT) [35C1].

11С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 72, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 74, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 76, LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262 или SEQ ID NO: 263; LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 155 и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 157. [все 6 CDR 10D12 с вариантами в LC-CDR1].

12С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 79, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 74, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 82, LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 159, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 155 и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO: 160. [все 6 CDR 35C1].

13С. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

14С. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab'-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

15С. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, также включающие константную область иммуноглобулина.

16С. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

17С. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере

на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 253 или SEQ ID NO: 279 [родительские, гуманизированные и модифицированные варианты 10D12].

18C. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 29 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 44 [35C1].

19C. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, где указанное антитело связывается с человеческим MASP-3 с аффинностью менее, чем 500 пМ.

20C. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

21C. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.1C-20C и фармацевтически приемлемый эксципиент.

C. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела группы IC, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP (13B1 и варианты).

1D. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG), или SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и

(b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1 представленную как SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKKNYLA), SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKKNYLA); SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKKNYLA); или SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKKNYLA), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES); и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT) [все 6 CDR 13B1 и варианты в LC-CDR1].

2D. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 258. [вариант 13B1 LC-CDR1 NA].

3D. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.1, 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышиного антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

4D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

5D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, также включающие константную область иммуноглобулина.

6D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

7D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 254 или SEQ ID NO: 255 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 280 [родительские, гуманизированные и модифицированные варианты 13B1].

8D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где указанное антитело связывается с человеческим MASP-3 с аффинностью менее, чем 500 пМ.

9D. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

10D. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1D-9D и фармацевтически приемлемый эксципиент.

D. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела группы II, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP (1G4).

1E. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 91 (GYWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG) и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 95 (SIDY); и

(b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 165 (KVSNRFS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 167 (SQSTHVPPT).

2E. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

3E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

4E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, также включающие константную область иммуноглобулина.

5E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

6E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 31 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 46 [1G4].

7E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где указанное антитело связывается с человеческим MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ.

8E. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

9E. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1E-8E и фармацевтически приемлемый эксципиент.

F. Высокоаффинные MASP-3-ингибирующие антитела группы III, которые связываются с одним или более эпитопами в домене SP (1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11, 2F2, 11B6).

1F. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 109 (RVHFAIRDNTNYWMQ), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 112 (GSHYFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 182 (RASQSIGTSIH), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 184 (YASESIS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 186 (QQSNSWPYT) [1E7]; или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 125 (DYYMN), HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 129 (CPFYYLGKGTHTFDY); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 198 (YTSRLHS) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 200 (QQGFTLPWT) [2D7]; или

(c) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 132, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 133, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 135; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 203, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 165 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 204 [49C11]; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 137, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 138, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 140; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 206, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 207 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 208 [15D9]; или

(e) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 98, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 99, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 101; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 169, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 171 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 173 [2F5]; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 103, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 105, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 107; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 176, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193 [1B11]; или

(g) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 116, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 118; и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 188, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 190 [2F2]; или

(h) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO:

114, HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 121, HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 123; и варибельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 191, LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 178 и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 193 [11B6].

2F. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 (a)-(g), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.

3F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.

4F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, также включающие константную область иммуноглобулина.

5F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

6F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 32 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 47 [1E7].

7F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 33 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 48 [2D7].

8F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 34 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 49 [49C11].

9F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 35 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 50 [15D9].

10F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 36 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 51 [2F5].

11F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 37 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 52 [1B11].

12F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 38 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 53 [2F2].

13F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 39 и легкую цепь, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 54 [11B6].

14F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где указанное антитело связывается с человеческим MASP-3 с аффинностью менее, чем 500 пМ.

15F. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.

16F. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.1F-15F и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Е. Применение MASP-3-ингибирующих антител для лечения АП-заболеваний.

1. Способ ингибирования активации комплемента альтернативного пути у млекопитающего, где указанный способ включает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для ингибирования активации комплемента альтернативного пути у млекопитающего.

2. Способ по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ.

3. Способ по п.1, где в результате введения композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, у млекопитающих наблюдаются один или более из нижеследующих признаков:

- (a) ингибирование созревания фактора D;
- (b) ингибирование альтернативного пути при введении индивидууму в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb);
- (c) отсутствие ингибирования классического пути;
- (d) ингибирование гемолиза и/или опсонизации;
- (e) снижение степени гемолиза или степени расщепления C3 и осаждения поверхностного C3b;
- (f) снижение осаждения фактора B и Bb на активирующей поверхности;
- (g) снижение остаточных уровней (в кровотоке и без экспериментальной дополнительной активации поверхности) активного фактора D по сравнению с про-фактором D;
- (h) снижение уровней активного фактора D по сравнению с про-фактором D в ответ на активацию поверхности; и/или
- (i) снижение уровня продуцирования остаточных и индуцированных на поверхности уровней жидкофазных Ba, Bb, C3b или C3a.

4. Способ по п.1, где антитело ингибирует альтернативный путь в молярном отношении приблизительно от 1:1 до приблизительно 2,5:1 (MASP-3-мишень: mAb).

5. Способ по любому из пп.1-3, где высокоаффинное анти-MASP-3 антитело охарактеризовано по любому из п.27A, 25B, 21C, 10D, 9E или 16F.

6. Способ по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно ингибируют альтернативный путь, но не влияют на активацию классического пути.

7. Способ по любому из пп.1-4, где млекопитающее страдает или имеет риск развития заболевания или расстройства, ассоциированного с альтернативным путем и выбранного из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП), включая мокрую и сухую ВДЖП, ишемическо-реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (ГУС), атипический гемолитический уремический синдром (аГУС) и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) или ТМА, ассоциированную с трансплантацией), астмы, болезни плотных отложений, олигоиммунного некрозирующего серповидного гломерулонефрита, черепно-мозговой травмы, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, нейромиеелита зрительного нерва, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, амиотрофического бокового склероза (АБС), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (СКВ), диабетической ретинопатии, увеита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), C3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (СВО), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), ANCA-вакулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и тяжелой миастении.

Хотя в изобретении описаны и проиллюстрированы предпочтительные варианты его осуществления, однако очевидно что в них могут быть внесены различные изменения, не выходящие за рамки существа и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и включают:

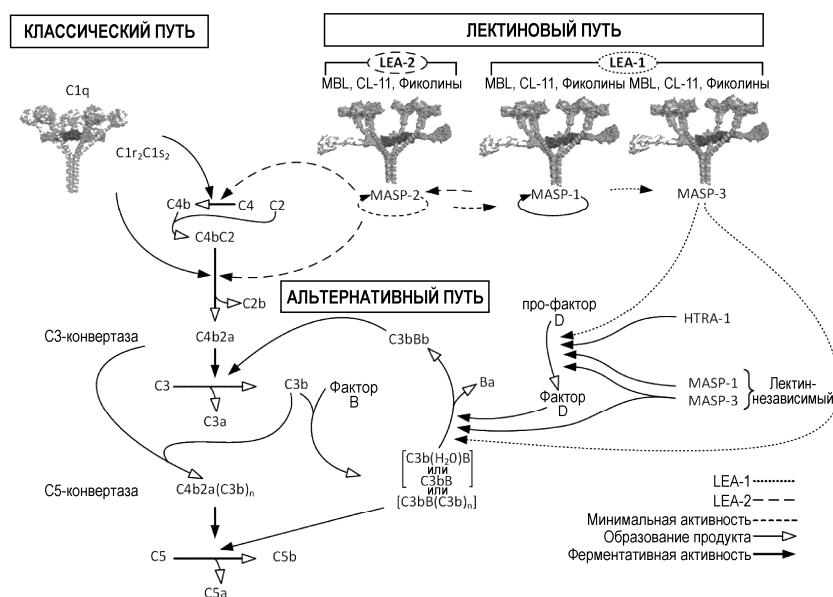
(a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и (b) вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES); и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT); или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES); и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT); или

(c) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT); или

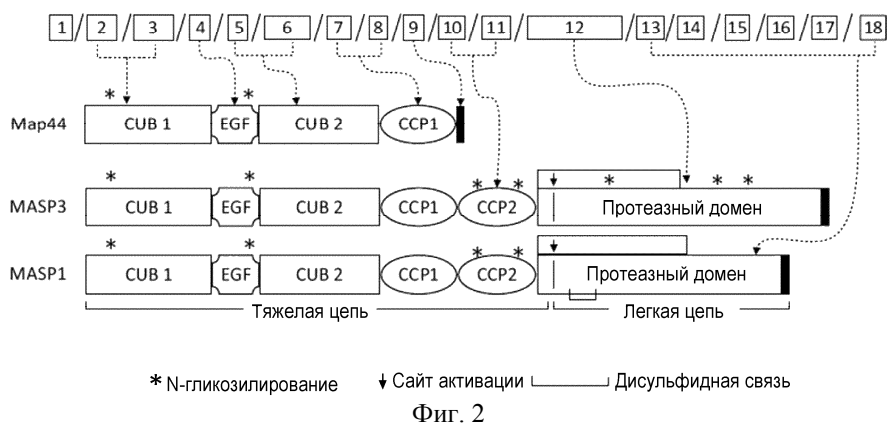
(d) вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 84 (GKWIE); HC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG); и HC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 88 (SEDV); и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, представленную как SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); LC-CDR2, представленную как SEQ ID NO: 144 (WASTRES) и LC-CDR3, представленную как SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT).

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 252 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 279.
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 29 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 44.
15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 24 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 40.
16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 248 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 250.
17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 249 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 250.
18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 248 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 278.
19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 249 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 278.
20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 25 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 41.
21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 26 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 42.
22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 27 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 42.
23. Комбинация выделенной последовательности ДНК, кодирующей переменную область тяжелой цепи и выделенной последовательности ДНК, кодирующей переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-22.
24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышиного антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных антител.
25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, не содержащего шарнирной области и целого антитела.
26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, также включающие константную область иммуноглобулина.
27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.
28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где указанное антитело связывается с доменом сериновой протеазы человеческого MASP-3 с аффинностью менее чем 500 пМ.
29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где указанное антитело ингибирует активацию альтернативного пути в крови млекопитающего.
30. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая переменную область тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-22.
31. Клонированный или экспрессионный вектор, содержащий одну или более последовательностей ДНК по п.30 или комбинацию двух или более клонируемых или экспрессионных векторов, которые содержат комбинацию последовательностей ДНК по п.23.
32. Клетка-хозяин, содержащая один или более клонируемых или экспрессионных векторов по п.31.
33. Способ продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-22, включающий культивирование клетки-хозяина по п.32 и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
34. Композиция для ингибирования активации комплемента альтернативного пути, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
35. Способ ингибирования активации комплемента альтернативного пути у млекопитающего, где указанный способ включает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, композиции по п.34, содержащей высокоаффинное MASP-3-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для ингибирования активации комплемента альтернативного пути у млекопитающего.



Фиг. 1

МАСP-1 и 3



Фиг. 2

Человеческий МАСP-3 (SEQ ID NO: 2)

```

MRWLLLYALCFSLSKASAHTELVNLMFGQIQSPGYDPSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYD
YVKVETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELS
CDHYCHNYIGGYYSRCRFGYILHTDNRTCRVECSNDLFTQRTGVITSPDFPNPYKSECLYTIIEEGFMVNLQF
EDIFDIEDHPVPCPYDIKIKVGPKVLGPFCGEKAPEPISTQSHSVLILFHSNDSNGENRGWRLSYRAAG
NECPQLQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIECLKDGTSNKIPTCKIIVDCRAPGELE
HGLITFSTRNNLTYYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKVLRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRI
IGGRNAEPGLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFSGALLSASWILTAHVLRQRRDITVI PVSKHEHTVYVLGLHDVR
DKSGAVNSSAARVVLHPDFNIQYNHDIQVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPAPHMLGLVAGWGISNPNTV
DEIISSGTRTSLDVLQYVKLPVVPFAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYEGGKDTCLGDSGGAFVIFDDLQSRW
VVQGLVSWGGFEECGSKQVYGVYTKVSNYVDWVWEQMLPQSVVEPQVER

```

Legend:

- * N-гликозилирование (N-glycosylation)
- ↓ Сайт активации (Activation site)
- Дисульфидная связь (Disulfide bond)

Фиг. 3

Белок MASP-3: выравнивание для множества видов

Человек_M-3	MRNLLIVLALQFLSKARANTVELIRNFGGICSPGVISVPSDE	UTNHTVDSQFRRLVFNHFLSSVLKVYVUTVETDQ/LATQGRE	TDEQTSGLVTLVSGGSMSTTFPSFSENERSTGTAMHATVLEICE	150
Супло_M-3	H.....D.....	E.....	N.....	
Кролик_M-3	CH.....L.....D.....	E.....	N.....	
Крыса_M-3	MRFLSP.R.....MT.....LT.....TEV.....	E.....V.....	N.....	
Мышь_M-3	MRFLSPK.....N.....LA.....VEV.....	E.....	N.....	
Курица_M-3	VP.ARNKCAEL.....STNG.....	TD.....E.R.A.....HT.....	S.E.H.....V.....D.....I.S.A.....E.....A.....Q.E.....PY.....SC.....T.....	
151				
Человек_M-3	ACEELSDEHNHNVGGVGVSCRFQGLNLTNPFCRVECSNLTFRQG	VTSISFFNFTVSSSEGLNLTIELEGGMVNLQFECDFICENHVPQPVY	VKNHNVGNLGGFCGNAPEFISTGSNVLILFLHSNGSGMSSKLSRP	200
Супло_M-3	N.....	N.....	N.....	
Кролик_M-3	N.....	Y.....F.....IS.....	EN.H.....V.....A.....Q.....P.....	
Крыса_M-3	S.....	T.....V.....S.....E.....T.....	A.S.H.....S.....I.....R.....	
Мышь_M-3	S.....	T.....V.....S.....E.....T.....	A.S.H.....S.....I.....R.....	
Курица_M-3	KS.....A.....S.....K.....V.....S.....	TLA.....S.....D.....R.....F.....S.....S.....V.....T.....	A.R.EF.....S.G.R.D.....TN.....I.....R.....K.....IT	
201				
Человек_M-3	AAGNLSFELGPNKHEFSKANYFNDQVLYSCQVNVNKHNTKMTF	CECLNGGVMNKHSTCKNVLDCAPASLENGLITSTIRNLTIVSEKNY	SCQEPYVMNNNTGINTGSAQVMMNNLGGSLTCLFECTGFSRLSP	450
Супло_M-3	S.....	S.....	S.....	
Кролик_M-3	S.....D.....L.....C.....	M.....P.....L.....S.....S.....A.....T.....	Q.....RL.H.M.....V.....I.....P.....S.....	
Крыса_M-3	S.....	E.....	S.....	
Мышь_M-3	K.....V.....S.....S.....G.....	A.....S.....G.....A.....K.....F.....	H.....T.....V.....H.....T.....E.....K.....V.....A.....N.....	
Курица_M-3	P.....V.....IN.....T.....VE.....N.....I.S.S.....	I.....A.....Q.....P.....K.....V.....LS.....	RAF.....Q.....N.....K.....H.A.D.S.A.T.....D.S.....RBER.....TN.....S.A.V.....R.V.A.....G.....	
451				
Человек_M-3	LVNRTSGGNHSPGLFFNQLATVTESTRVHNKNTSGALLSASNLTA	AMVLSRSDRTVTFSENVTVVLGLNIVKNSGAMSSAAATVLMPIF	HQVNNHICALVLEEFVPLGNVMPVCLPRLEP-----SPAFNMGLVAVN	600
Супло_M-3	S.....	S.....	S.....	
Кролик_M-3	S.....	S.....	S.....	
Крыса_M-3	S.....	S.....	S.....	
Мышь_M-3	S.....	S.....	S.....	
Курица_M-3	F.....M.....	I.....V.....	K.....N.....E.....ATVE.....I.....E.....D.....	
601				
Человек_M-3	GLSNFTVTEISGGSTRLSNQLQVNLPTPHALNCTSVESAGNVSV	TENKFCAGVYESGKRTCLSGGCAVTFCLSGMNVGLVSGGFEEDG	SHQVGVTVNWNVNVWVWNGMGLSPSTETTES	SEG ID PG01
Супло_M-3	S.....	S.....	S.....	SEG ID PG02
Кролик_M-3	S.....	S.....	S.....	SEG ID PG03
Крыса_M-3	S.....	S.....	S.....	SEG ID PG04
Мышь_M-3	S.....	S.....	S.....	SEG ID PG05
Курица_M-3	M.....	I.....	Q.FGR.....A.....	SEG ID PG06

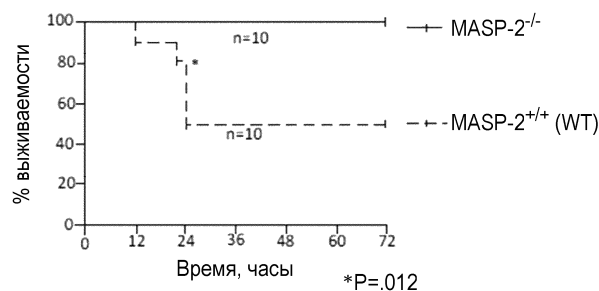
Фиг. 4

Домен SP MASP-3: выравнивание для множества видов

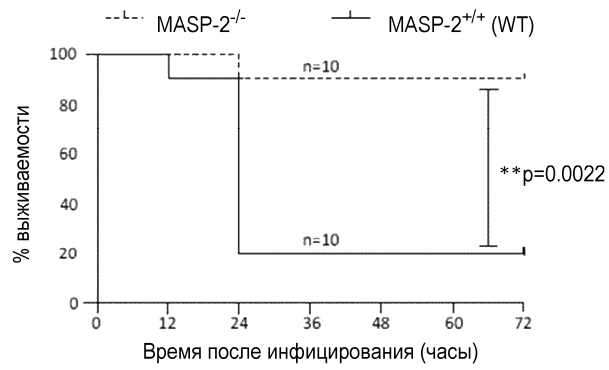
[illegible]

ФИГ. 5

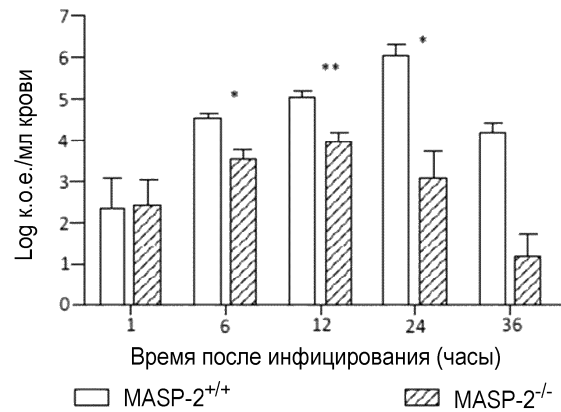
Выживаемость после инфицирования бактерией *N. meningitidis* серологической группы A Z2491



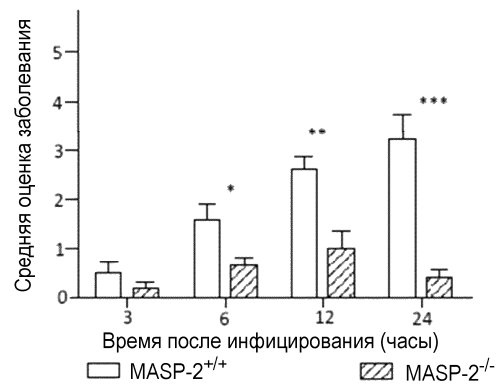
ФИГ. 6



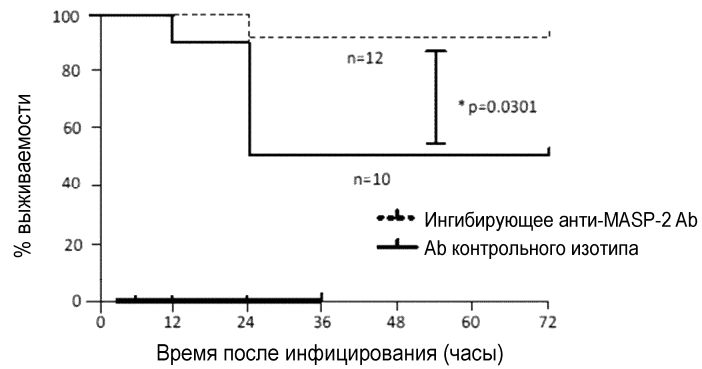
Фиг. 7



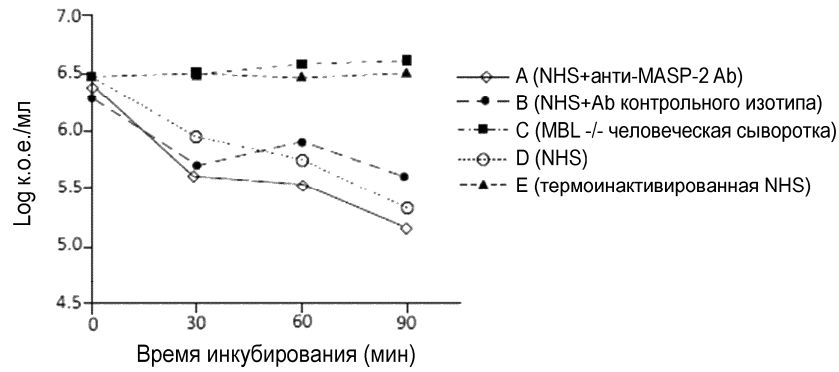
Фиг. 8



Фиг. 9

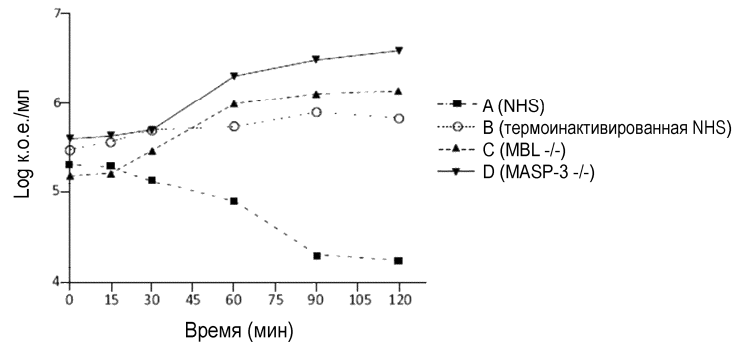


Фиг. 10

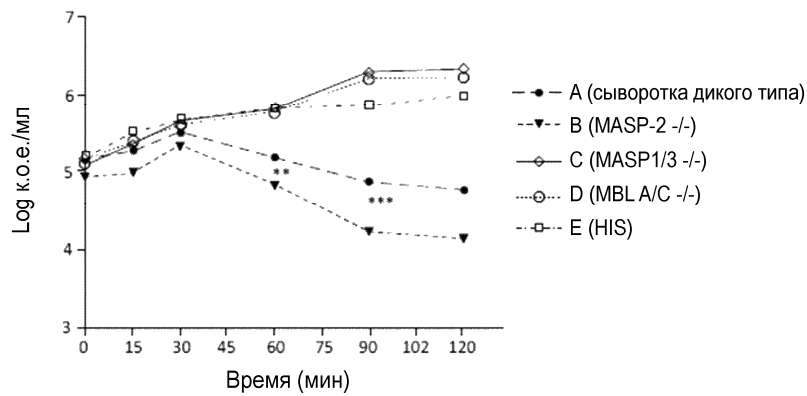


Фиг. 11

Комплемент-зависимый цитоллиз *Neisseria meningitidis*
в человеческой 20% сыворотке (об/об)

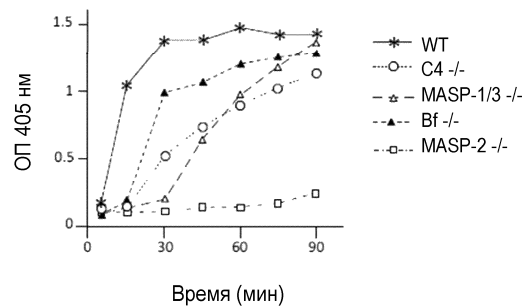


Фиг. 12

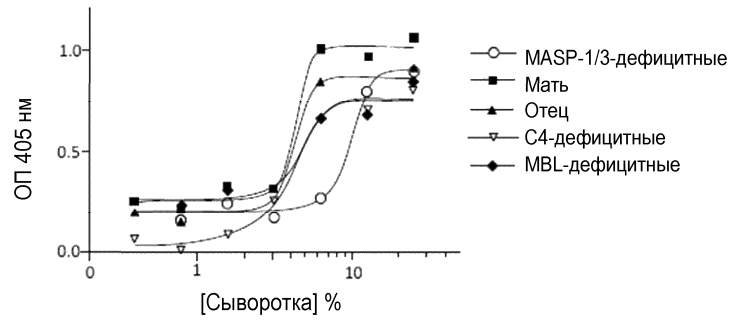


Фиг. 13

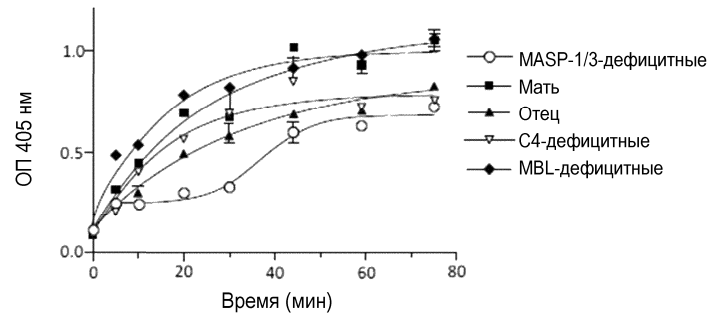
MASP-1/3-дефицитные мыши не являются дефицитными
по функциональной активности ЛП



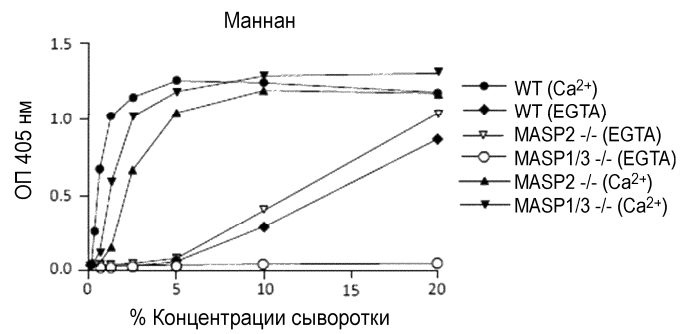
Фиг. 14



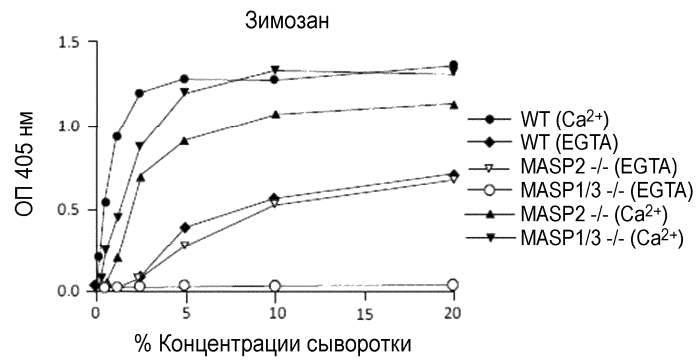
Фиг. 15



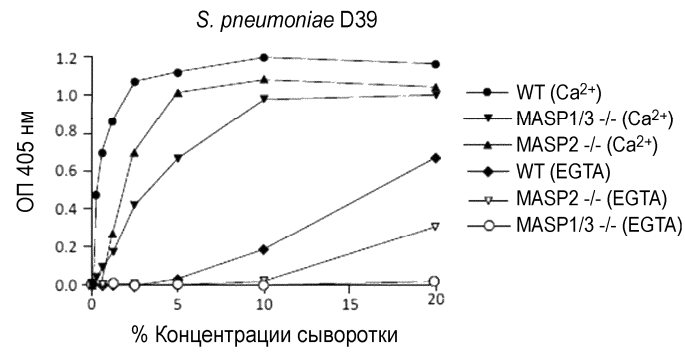
Фиг. 16



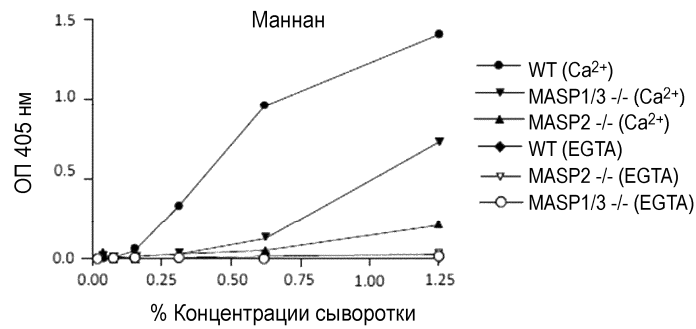
Фиг. 17А



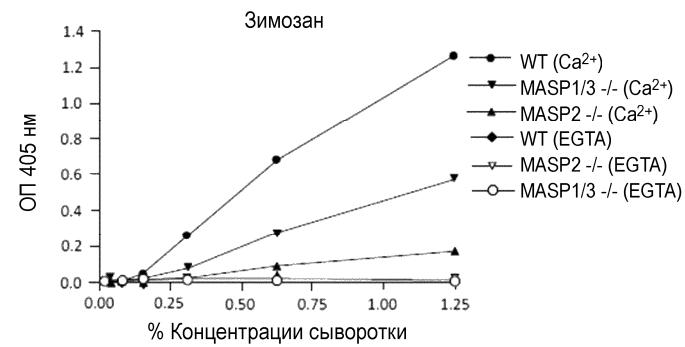
Фиг. 17В



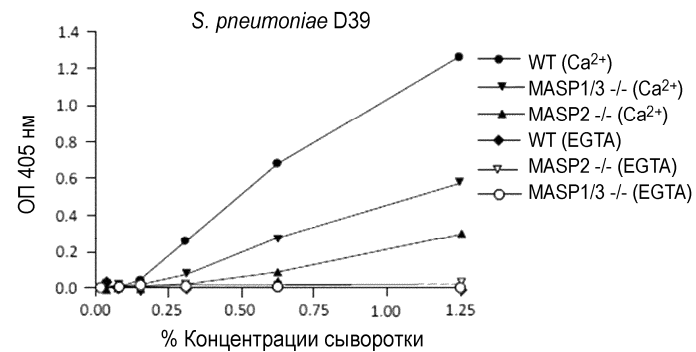
Фиг. 17С



Фиг. 18А

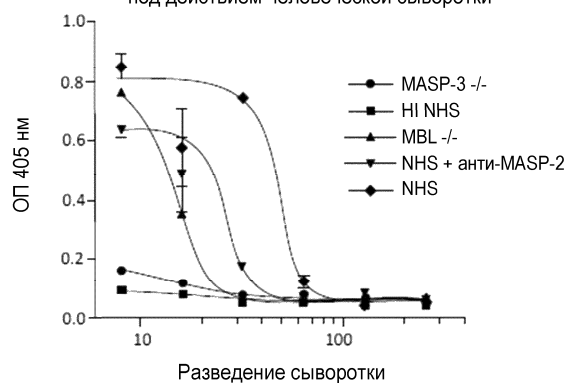


Фиг. 18В



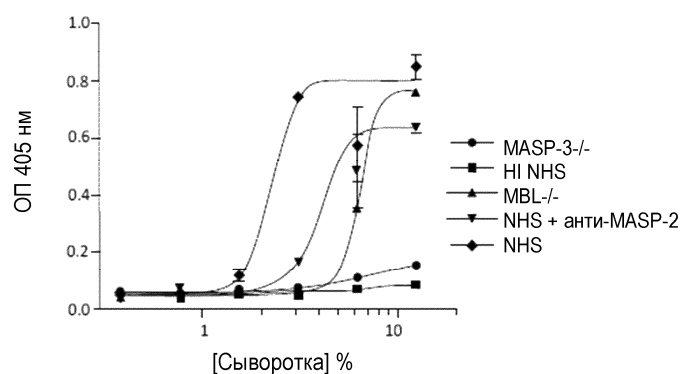
Фиг. 18С

Гемолиз покрытых маннаном мышиных эритроцитов
под действием человеческой сыворотки



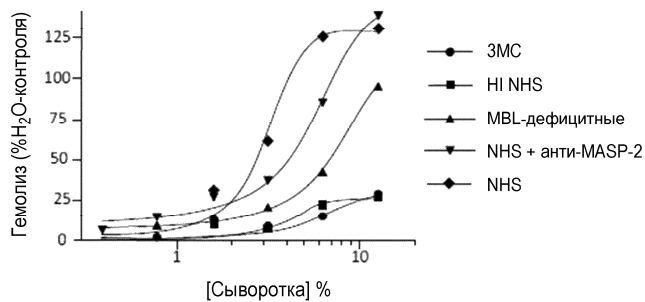
Фиг. 19

Гемолиз покрытых маннаном мышиных эритроцитов
под действием человеческой сыворотки



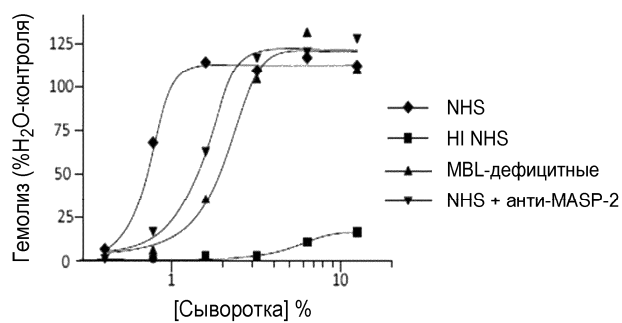
Фиг. 20

Гемолиз мышиных эритроцитов дикого типа под
действием человеческой сыворотки



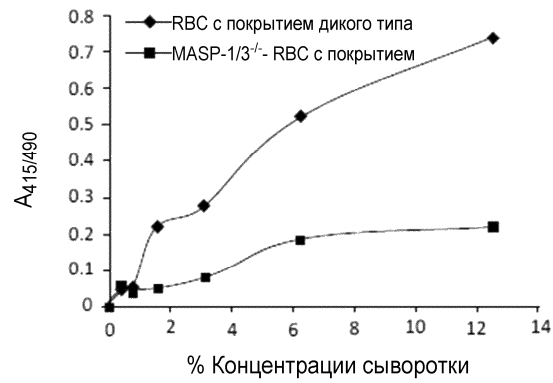
Фиг. 21

Гемолиз мышиных CD55/59 -/- эритроцитов под
действием человеческой сыворотки

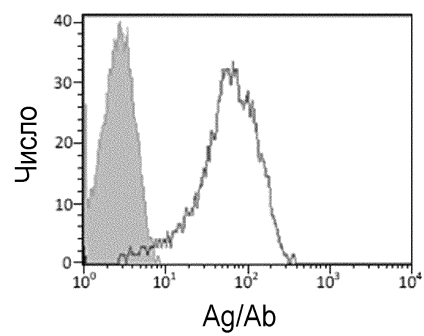


Фиг. 22

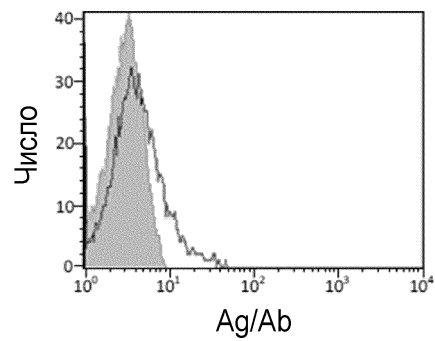
Анализ на гемолиз с использованием кроличьих RBC в сыворотке мышей дикого типа и MASP-1/3^{-/-}-мышей



Фиг. 23

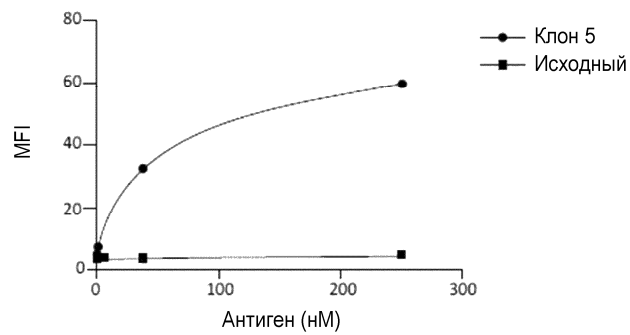


Фиг. 24А



Фиг. 24В

K_d = 31 нМ



Фиг. 25

	1	65
VH	AVT LDE SGGGLQTPGGALS LVCKASGFTFSS	NAMGVWRQAPGKGLEWVA
M3J5	G.....	Y.....M.....Y.....R.S.....F.L.T.....
M3M1	G.....D.....Y.Q.N.....	A.N.R.F.N.S.GHGA.....
D14	Y.H.....	Y.KS.A.N.....
1E10	YD.V.....	SRN.....RY.E.GS.....

	66	129
VH	KGRAT I SRDNGQST LRLQLNNL RAEDT GTYYCTK	CAYSS - GCDYEGG - - YIDAWGHGTEIVSS
M3J5	V.....A.F.....RSG.....NV.....D.....	
M3M1	V.....D.....S.....A.....A.GV.GYC.SYSCC.VDT.....	
D14	V.....A.....TTG.GCSSG.RAE.....	
1E10	V.....A.....ARD.GG.-AYWFDA.....Q.....	

ФИГ. 26А

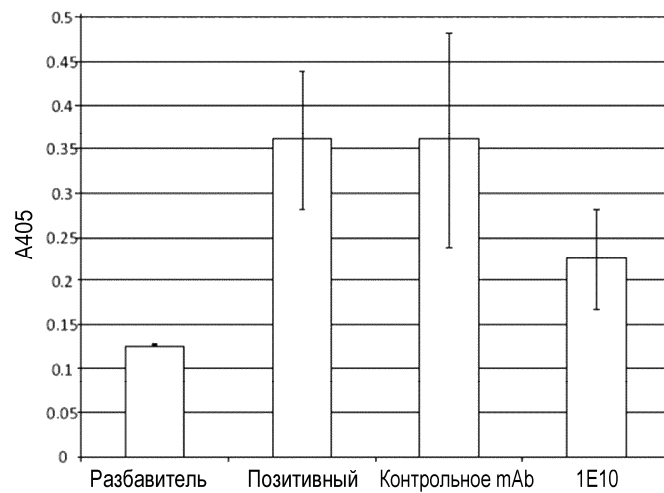
1 54

VL	ALTQPASVSNLGGTVKITCSGGGS-YAGSYYYGWYQKSPGSA	PVTVIYDNDK
M3J5	P.E.....Y.G.....A.....L.....Y.N	
M3M1	P.E.....A.....L.....Y.N	
D14	P.E.....A.....L.....Y.N	
1E10	P.E.....A.....L.....Y.N	

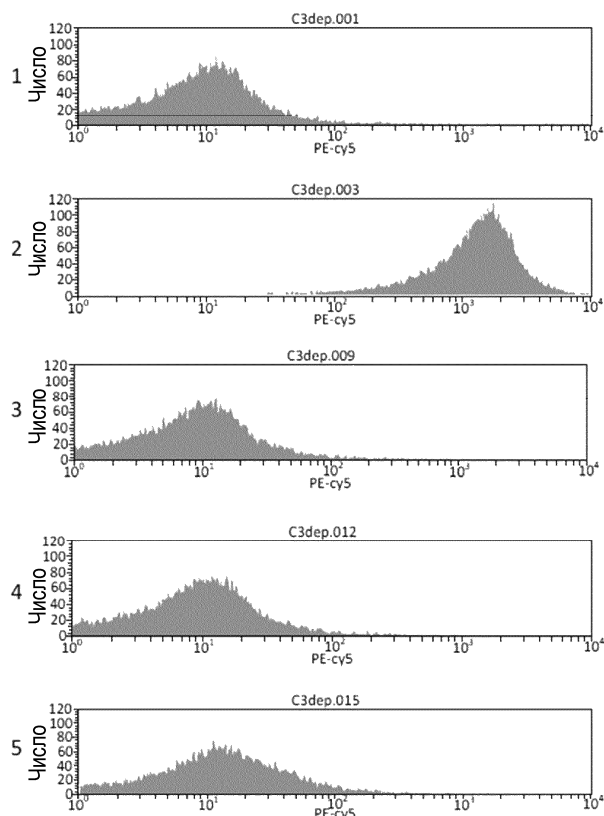
55 108

VL	RPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGA	AFGAGTTLTVL
M3J5	P.E.....A.....L.....Y.N	
M3M1	P.E.....A.....L.....Y.N	
D14	P.E.....A.....L.....Y.N	
1E10	P.E.....A.....L.....Y.N	

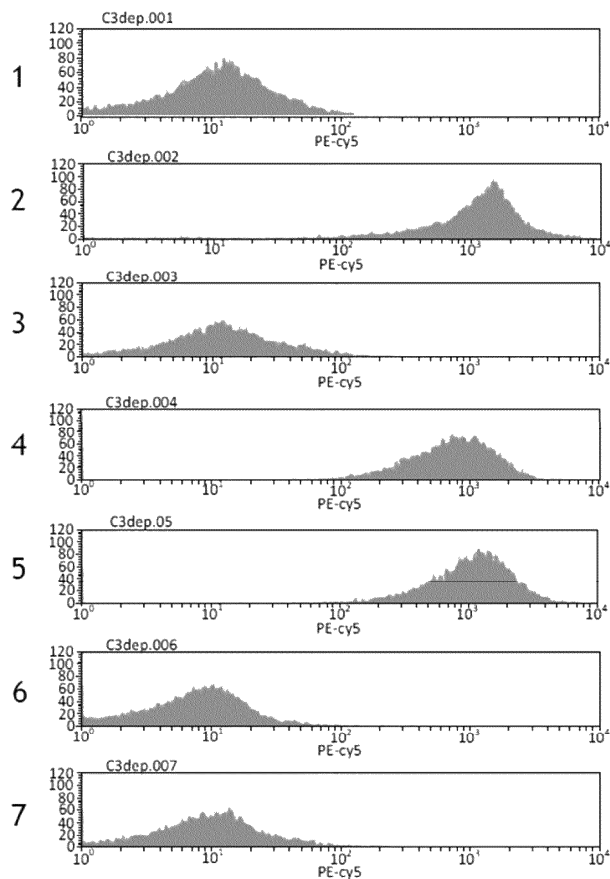
ФИГ. 26В



ФИГ. 27

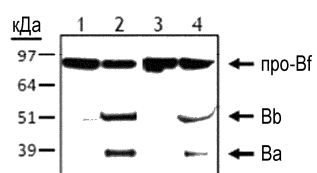
Осаждение СЗб на *S. Aureus*

Фиг. 28А

Осаждение СЗб на *S. Aureus*

Фиг. 28В

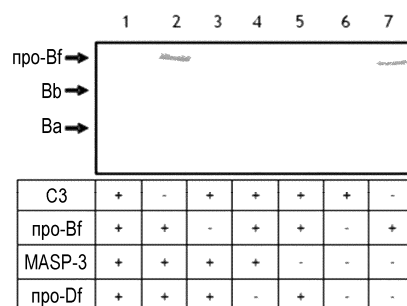
Расщепление фактора В в ответ на *S. aureus*



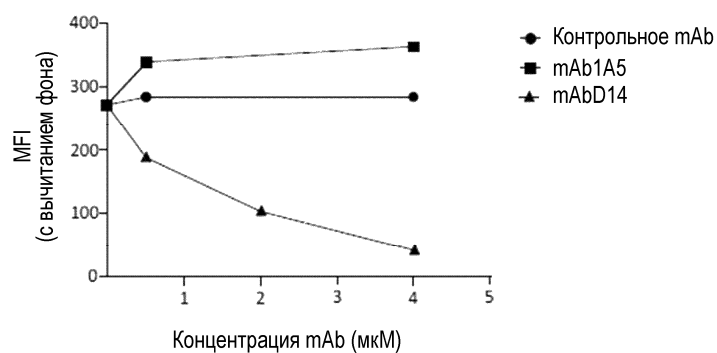
Добавление ЗМС-сыворотки с рекомбинантным MASP-3 не повышает уровень расщепления фактора В

Фиг. 29

MASP-3 непосредственно расщепляет про-Bf

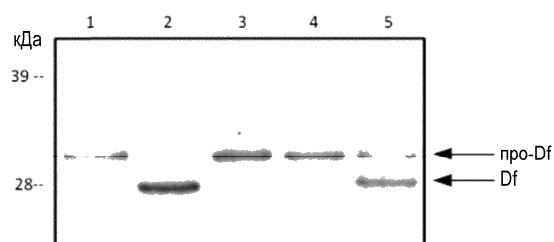


Фиг. 30



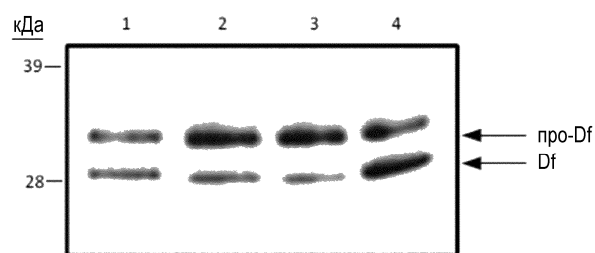
Фиг. 31

MASP-1 и MASP-3 активируют про-Df

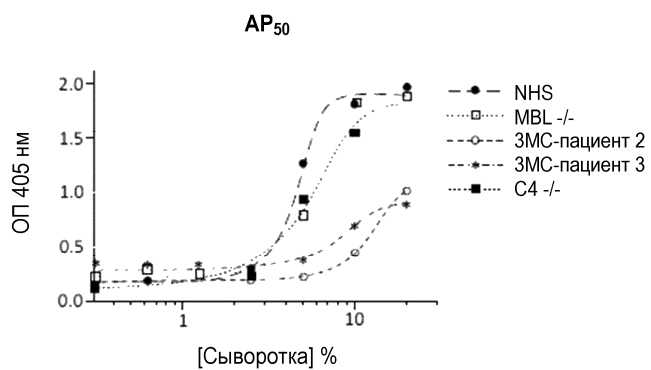


Фиг. 32

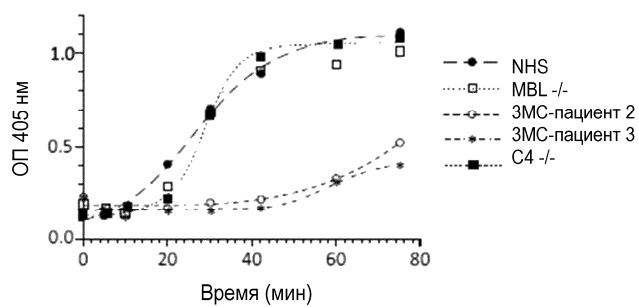
Частичное ингибирование MASP-3-зависимого расщепления
про-Df анти-MASP-3 антителами



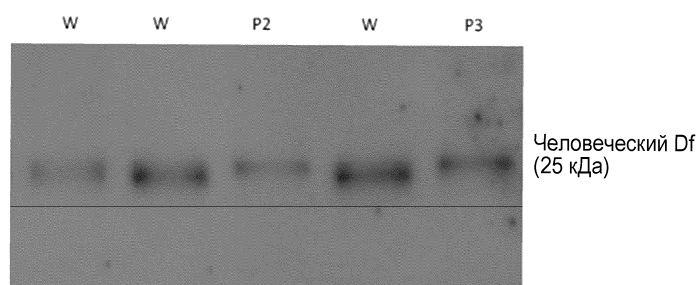
Фиг. 33



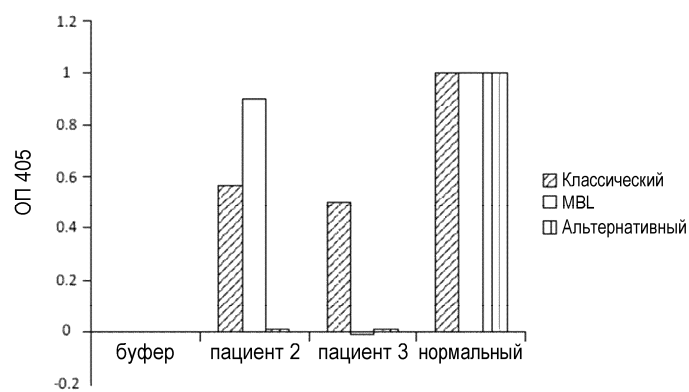
Фиг. 34



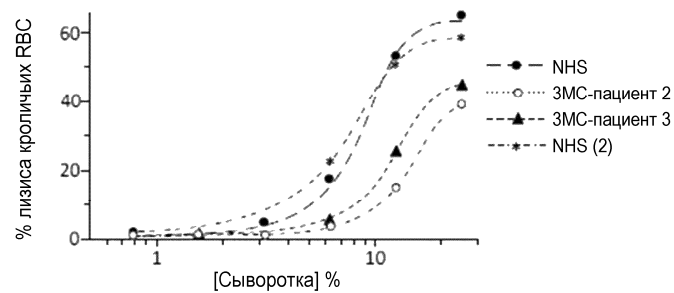
Фиг. 35А



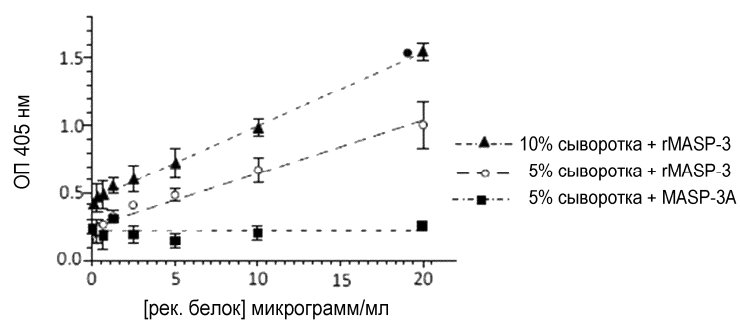
Фиг. 35В



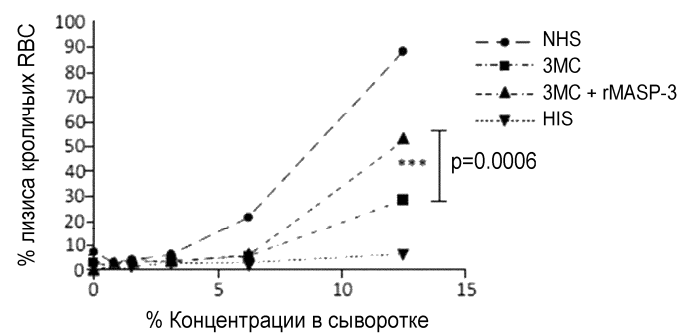
Фиг. 35С



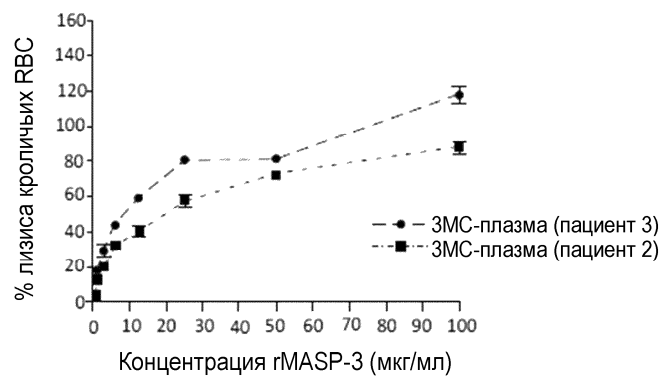
Фиг. 36



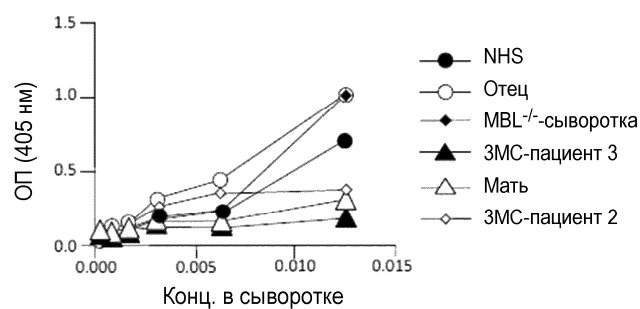
Фиг. 37



Фиг. 38

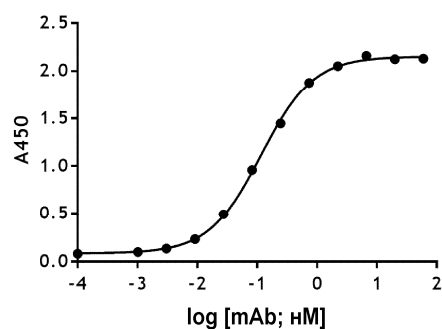


Фиг. 39



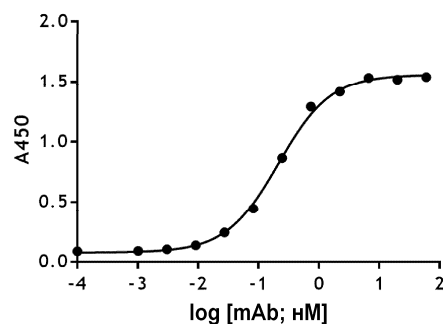
Фиг. 40

Связывание Fab M3-1 с человеческим MASP-3



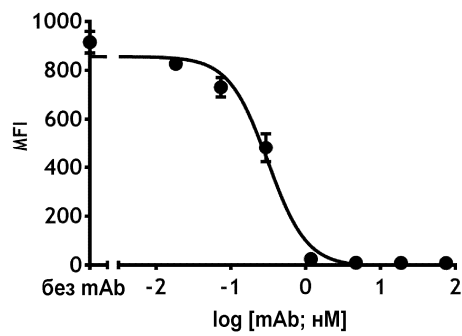
Фиг. 41

Связывание Fab M3-1 с мышинным MASP-3



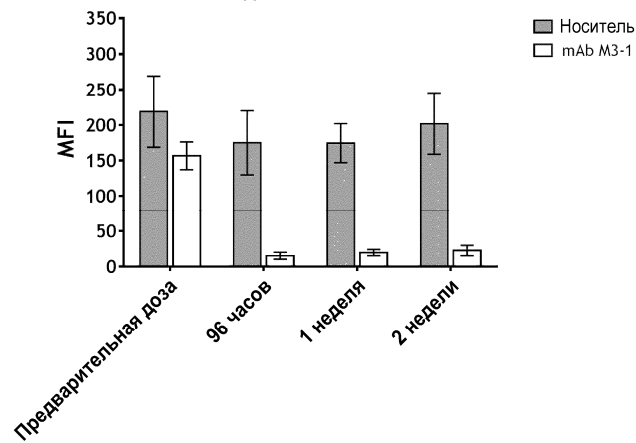
Фиг. 42

Осаждение фактора Вb на зимозане



Фиг. 43

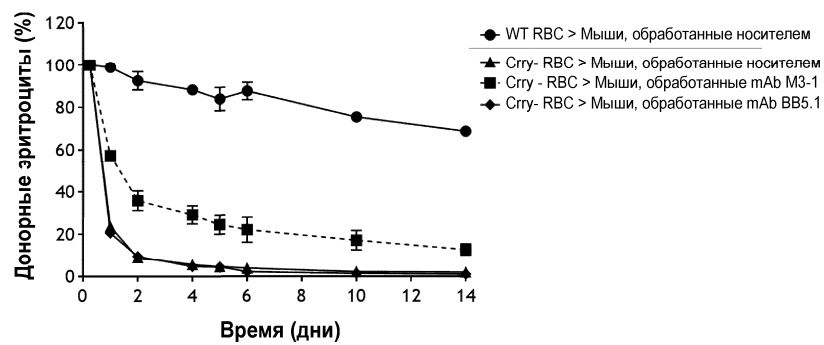
Осаждение СЗс на зимозане



Фиг. 44

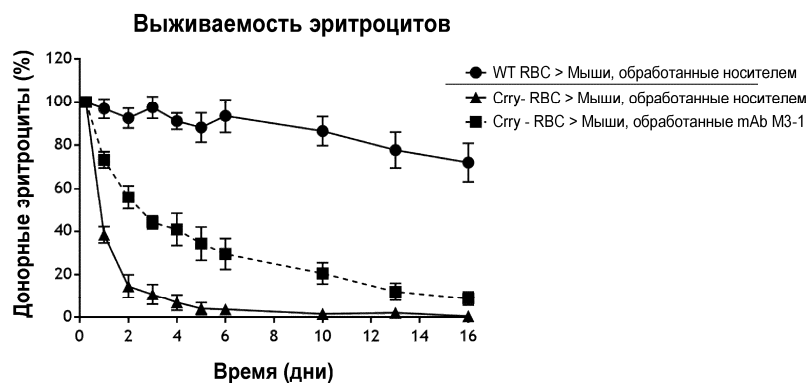
Проводимое исследование ПНГ

Выживаемость эритроцитов



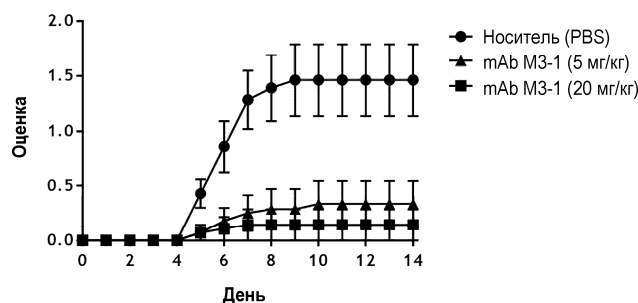
Фиг. 45

Выживаемость эритроцитов у обработанных мышей



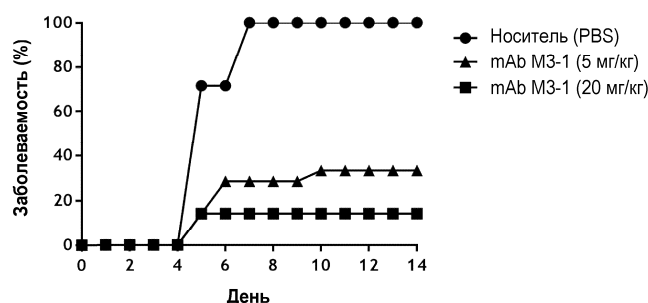
Фиг. 46

Клиническая оценка артрита



Фиг. 47

Заболееваемость артритом



Фиг. 48

Высокоаффинные анти-MASP-3 mAb: Вариабельная область тяжелой цепи

VB		35	50	65	80	95	110	
1Aa	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	NDININWQ	PGQLENIW	TYPRGDSIKY	NEKTFDQATL	TVVSSSTAF	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:28
1A1	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	NDININWQ	PGQLENIW	TYPRGDSIKY	NEKTFDQATL	TVVSSSTAF	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:27
4B6	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	NDININWQ	PGQLENIW	TYPRGDSIKY	NEKTFDQATL	TVVSSSTAF	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:26
4C8	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	NDININWQ	PGQLENIW	TYPRGDSIKY	NEKTFDQATL	TVVSSSTAF	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:24
1G4	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:21
1G8	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:20
1F8	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:16
1G9	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:15
1B1	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:12
1F9	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:11
1B6	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:09
1D1	QVQLKISGAE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:08
49C	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:04
1E7	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:02
1D2	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:01
95A	QVQLKISGPE LKIFGASVNL SCNASGTF	QVWIEWQ	PGQLENIW	ILPGSGSTHY	NEKTFDQATL	TACTSSNTAV	NEMLRLTSED	SAITFCSSVE D-----SYAGSGGGLV TVSS SIN:00

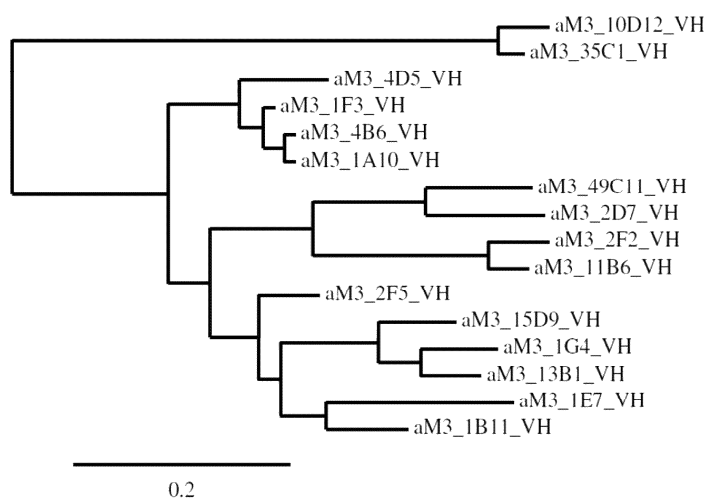
Фиг. 49А

Высокоаффинные анти-MASP-3 mAb: Вариабельная область легкой цепи

VL	Fabag	44	34	50	54	59	57	
176_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	ISRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL ---YTFGGGGT KLEINR SIN 41
486_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	ISRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL ---YTFGGGGT KLEINR SIN 42
428_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL ---YTFGGGGT KLEINR SIN 43
168_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL ---YTFGGGGT KLEINR SIN 45
164_VL	CDMTQSPFS	ISCKSSQSLV	QS-NGNTYLE	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 46
490_VL	CDMTQSPFS	ISCKSSQSLI	BS-NGNTYLE	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 49
100_VL	CDMTQSPFS	ISCKSSQSL	DS-DGKTYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 40
390_VL	CDMTQSPFS	ISCKSSQSL	DS-DGKTYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 44
075_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 51
18_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 51
1186_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 54
17_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 53
12_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 47
457_VL	CDMTQSPFS	MSCKSSQSL	NSRTTRQNYLA	WUQWFGQSP	KLLIVWASTR	ESGTFQRFPG	SGSGTDFTLT	ISSTVQAEPLA WUWQKGSYNL P-PYFGGGT KLEINR SIN 46

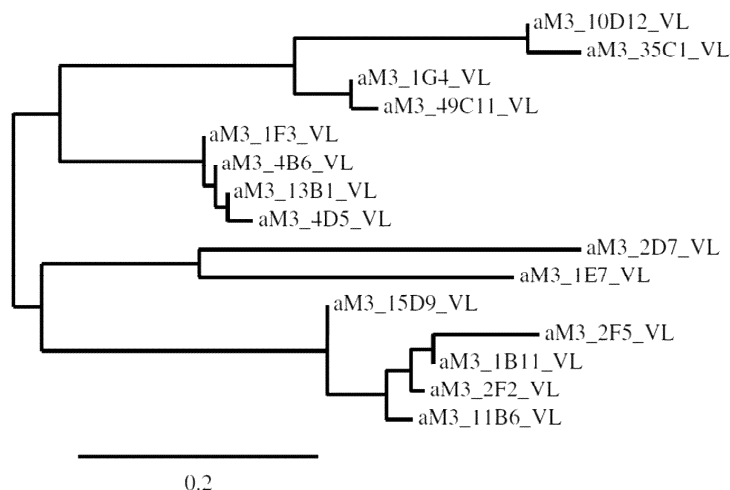
Фиг. 49B

Дендрограмма VH-областей высокоаффинных анти-MASP-3 mAb



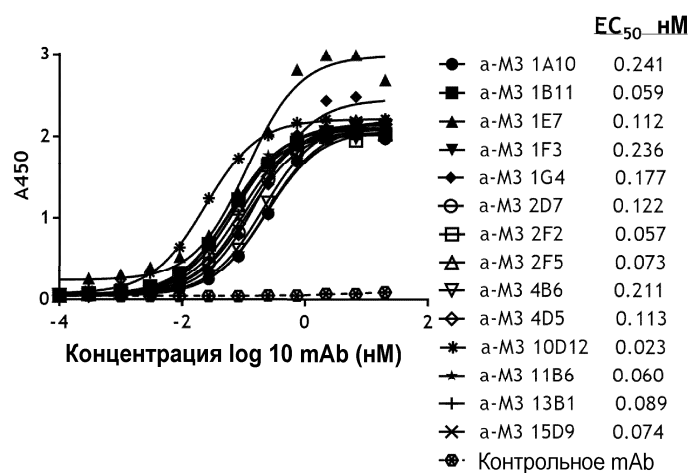
Фиг. 50A

Дендрограмма VL-областей высокоаффинных анти-MASP-3 mAb



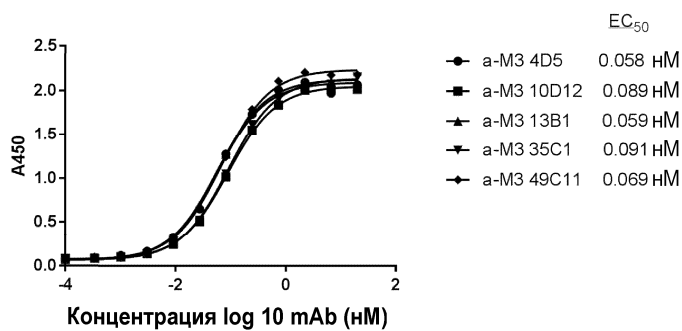
Фиг. 50B

Связывание очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 mAb с человеческим MASP-3



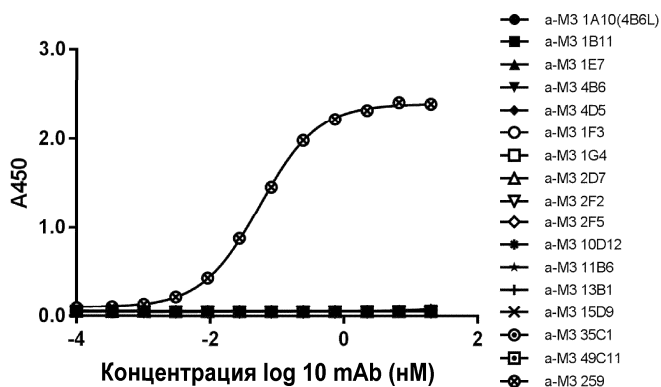
Фиг. 51А

Связывание очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 mAb с человеческим MASP-3



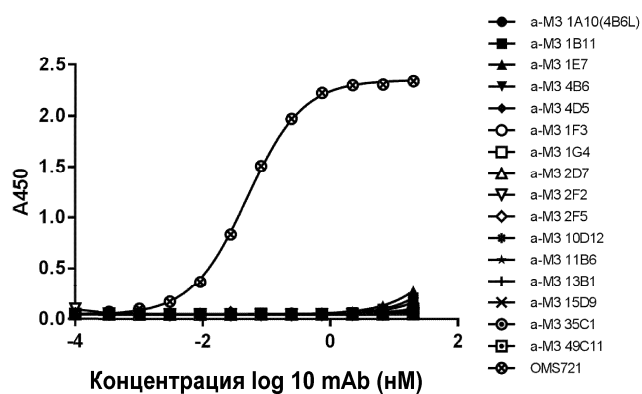
Фиг. 51В

Связывание очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 mAb с человеческим MASP-1



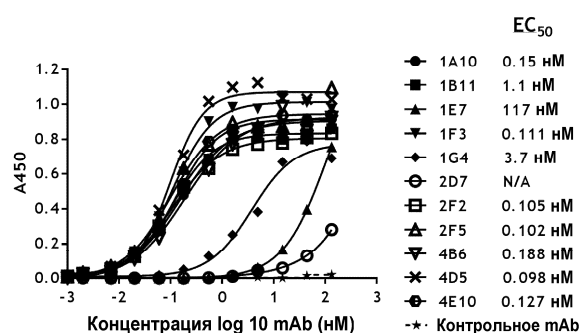
Фиг. 51С

Связывание очищенных рекомбинантных анти-MASP-3 mAb с человеческим MASP-2



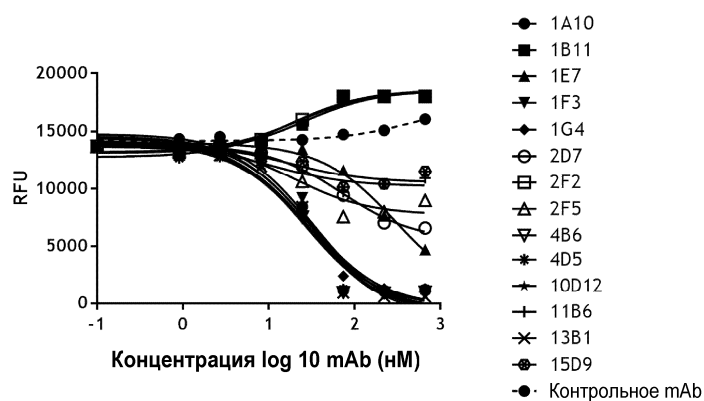
Фиг. 51D

Связывание анти-MASP-3 mAb с полноразмерным мышинным MASP-3



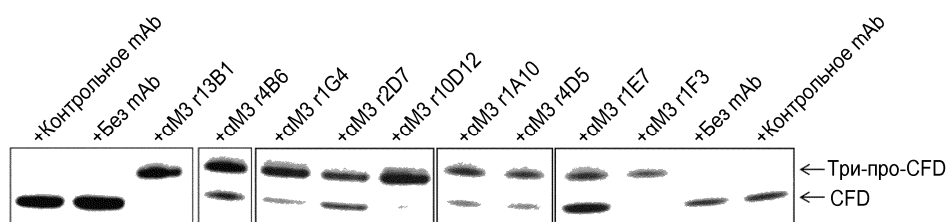
Фиг. 52

Ингибирование расщепления флуорогенного трипептида под действием анти-MASP-3 mAb



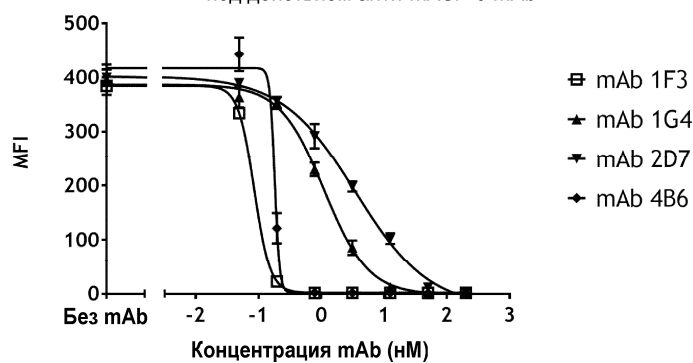
Фиг. 53

Высокоаффинное анти-MASP-3 mAb ингибирует расщепление CFD под действием rMASP-3



Фиг. 54

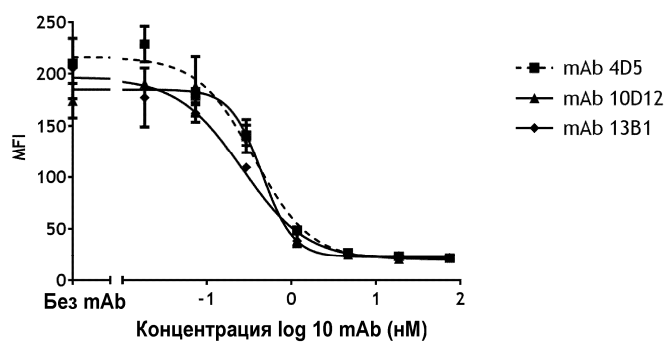
Ингибирование осаднения фактора Bb на зимозане
под действием анти-MASP-3 mAb



	mAb 1F3	mAb 1G4	mAb 2D7	mAb 4B6
IC50 (нМ)	0.1	1.1	3.5	0.2

Фиг. 55А

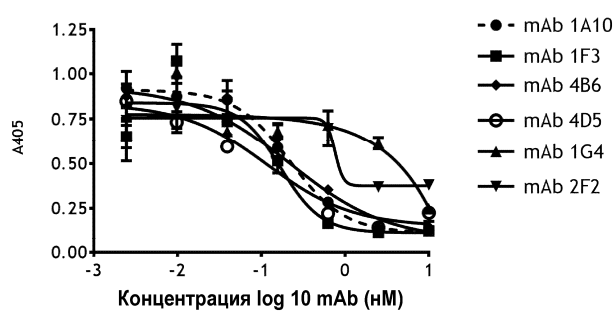
Ингибирование осаднения фактора Bb на зимозане
под действием анти-MASP-3 mAb



	mAb 4D5	mAb 10D12	mAb 13B1
IC50 (нМ)	0.4	0.5	0.3

Фиг. 55В

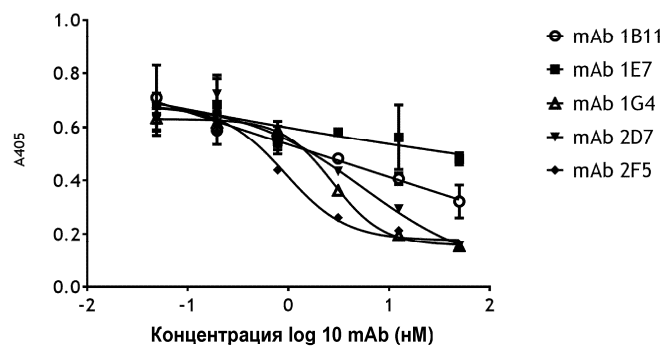
Ингибирование лизиса кроличьих эритроцитов
под действием анти-MASP-3 mAb



	mAb 1A10	mAb 1F3	mAb 1G4	mAb 2F2	mAb 4B6	mAb 4D5
IC50 (нМ)	0.2	0.2	-	0.8	0.2	0.1

Фиг. 56А

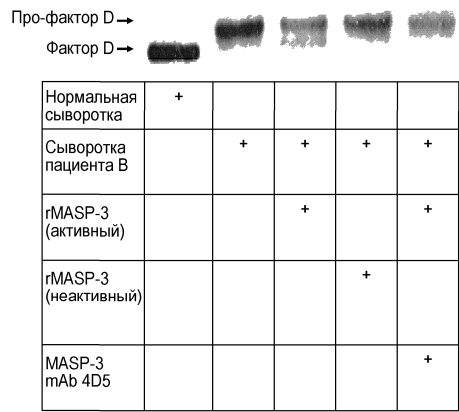
Ингибирование лизиса кроличьих эритроцитов
под действием анти-MASP-3 mAb



	mAb 1B11	mAb 1E7	mAb 1G4	mAb 2D7	mAb 2F5
IC50 (нМ)	-	-	2.7	5.4	0.9

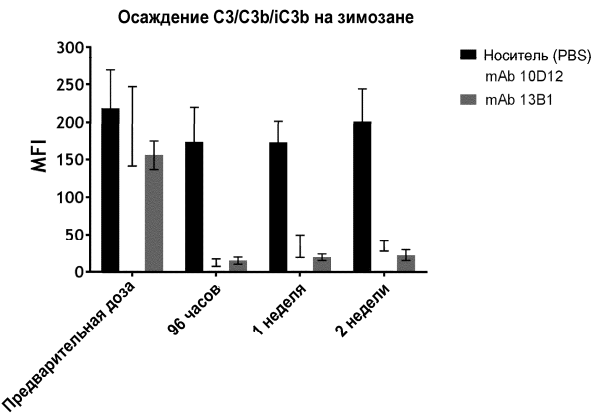
Фиг. 56В

Фактор D в ЗМС-сыворотке



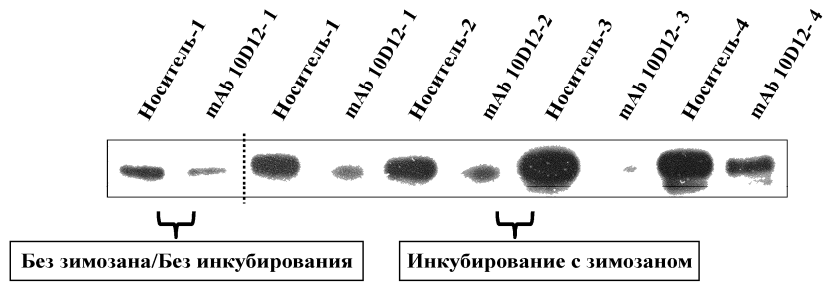
Фиг. 57

Анти-MASP-3 mAb ингибирует APC *in vivo*



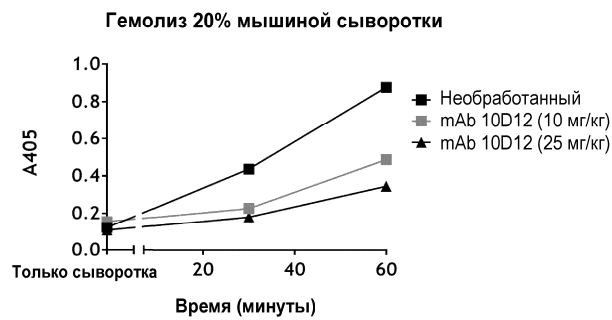
Фиг. 58

Статус фрагмента Ва фактора В у мышей, обработанных mAb 10D12



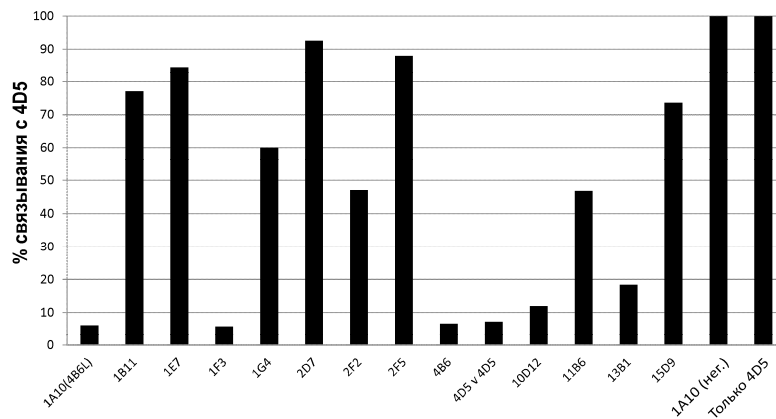
Фиг. 59

Сыворотка мышей, обработанных mAb 10D12, обнаруживает ингибирование гемолиза



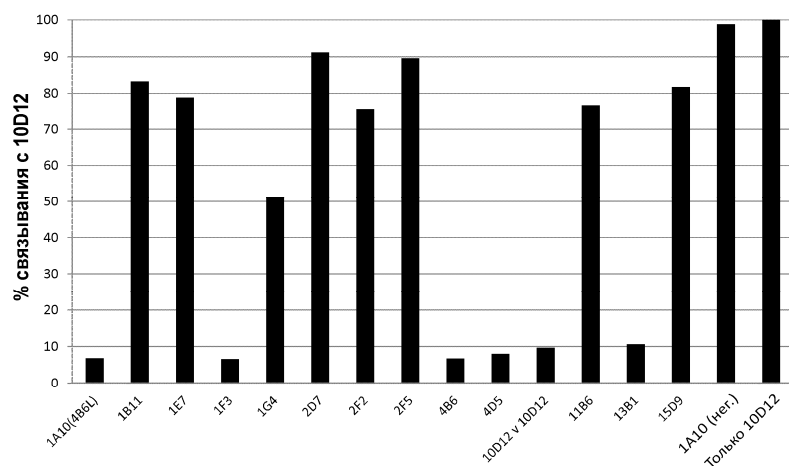
Фиг. 60

Анализ на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 4D5 (IgG1) и MASP-3



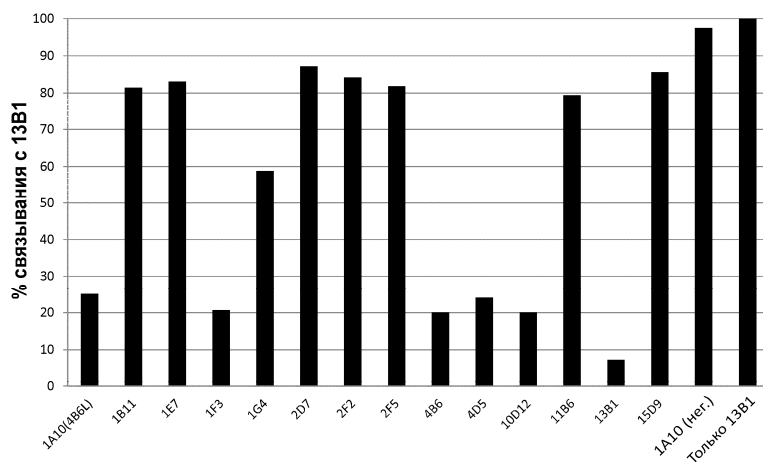
Фиг. 61A

Анализ на конкурентное связывание для идентификации
анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие
между mAb 10D12 (IgG1) и MASP-3



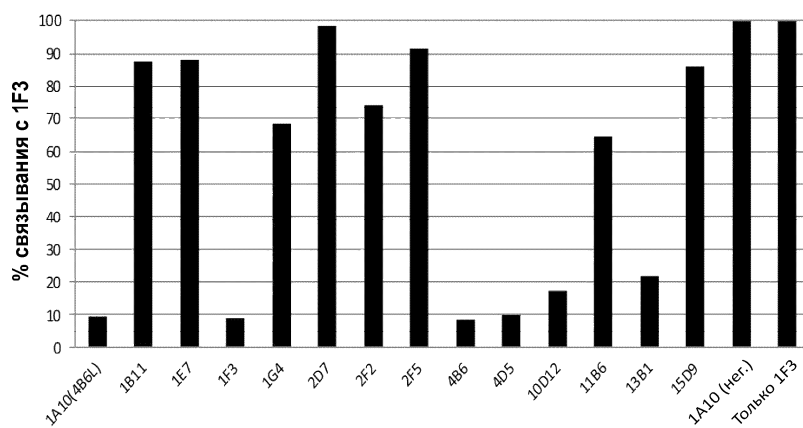
Фиг. 61B

Анализ на конкурентное связывание для идентификации
анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие
между mAb 13B1 (IgG1) и MASP-3



Фиг. 61C

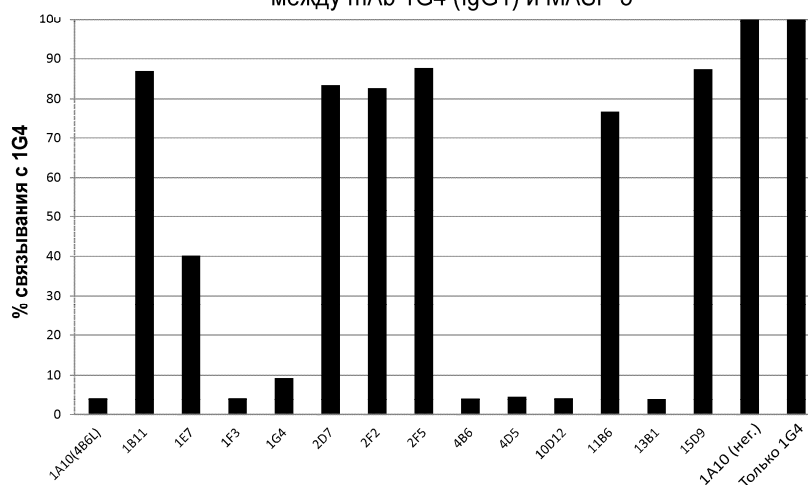
Анализ на конкурентное связывание для идентификации
анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие
между mAb 1F3 (IgG1) и MASP-3



Фиг. 61D

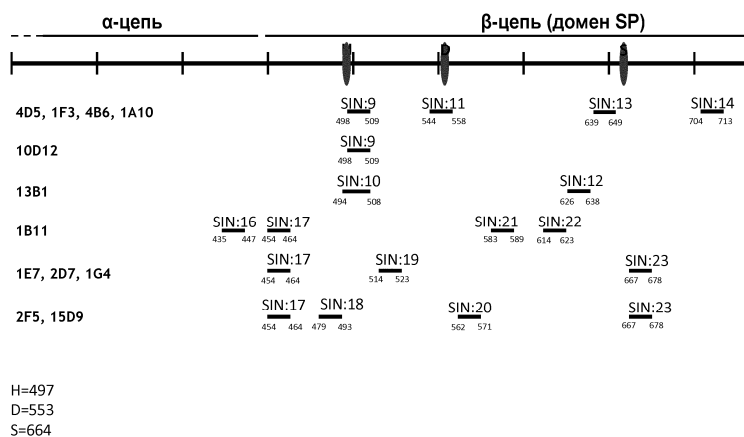
040888

Анализ на конкурентное связывание для идентификации анти-MASP-3 mAb (IgG4), которые блокируют взаимодействие между mAb 1G4 (IgG1) и MASP-3



Фиг. 61E

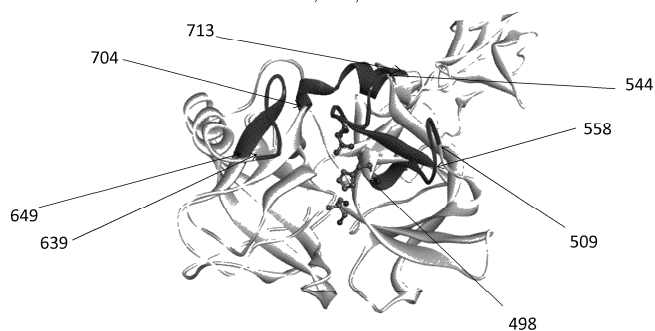
Области контактирования на MASP-3 с анти-MASP-3 mAb



Примечание: #9-#23 «SIN» означает SEQ ID NO:

Фиг. 62

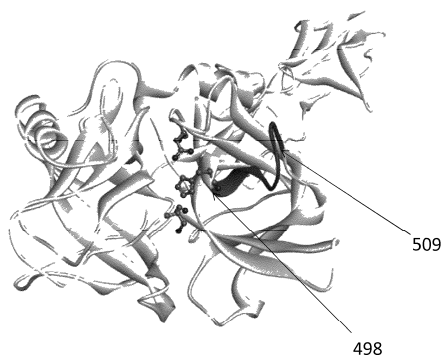
Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 1F3, 4B6, 4D5 и 1A10



SEQ ID NO:9 = а.к. остатки 498-509 MASP-3
 SEQ ID NO:11 = а.к. остатки 544-558 MASP-3
 SEQ ID NO:13 = а.к. остатки 639-649 MASP-3
 SEQ ID NO:14 = а.к. остатки 704-713 MASP-3

Фиг. 63A

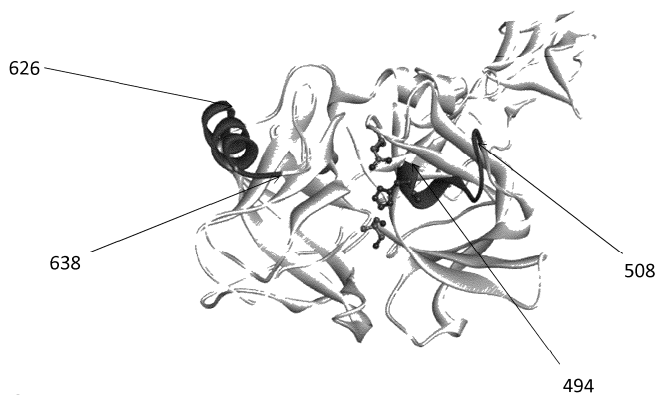
Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 10D12



SEQ ID NO:9 = а.к. остатки 498-509 MASP-3

Фиг. 63В

Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 13B1

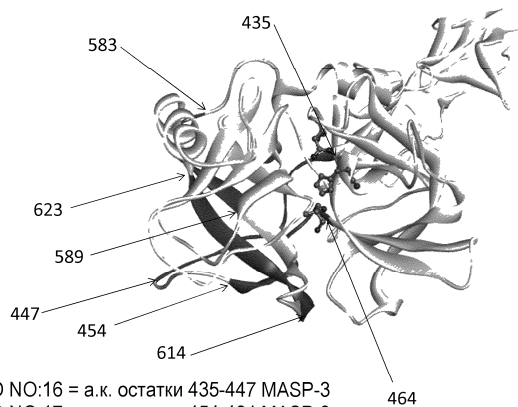


SEQ ID NO:10 = а.к. остатки 494-508 MASP-3

SEQ ID NO:12 = а.к. остатки 626-638 MASP-3

Фиг. 64

Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 1B11



SEQ ID NO:16 = а.к. остатки 435-447 MASP-3

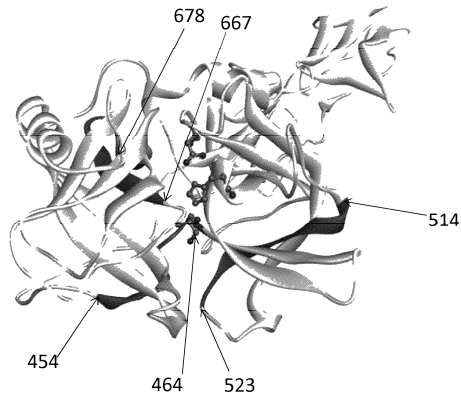
SEQ ID NO:17 = а.к. остатки 454-464 MASP-3

SEQ ID NO:21 = а.к. остатки 583-589 MASP-3

SEQ ID NO:22 = а.к. остатки 614-623 MASP-3

Фиг. 65

Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 1E7, 1G4 и 2D7



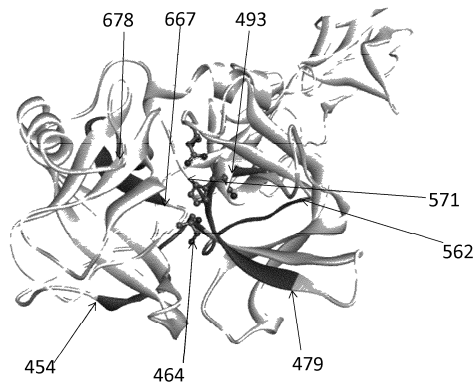
SEQ ID NO:17 = а.к. остатки 454-464 MASP-3

SEQ ID NO:19 = а.к. остатки 514-523 MASP-3

SEQ ID NO:23 = а.к. остатки 667-678 MASP-3

Фиг. 66

Области контактирования на человеческом MASP-3 с mAb 15D9 и 2F5



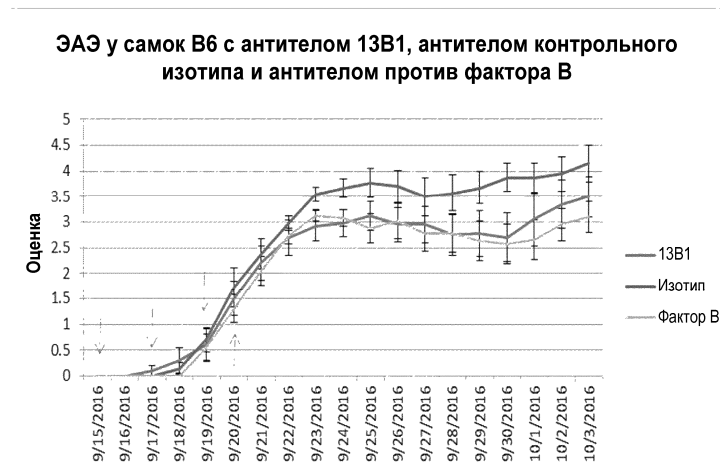
SEQ ID NO:17 = а.к. остатки 454-464 MASP-3

SEQ ID NO:18 = а.к. остатки 479-493 MASP-3

SEQ ID NO:20 = а.к. остатки 562-571 MASP-3

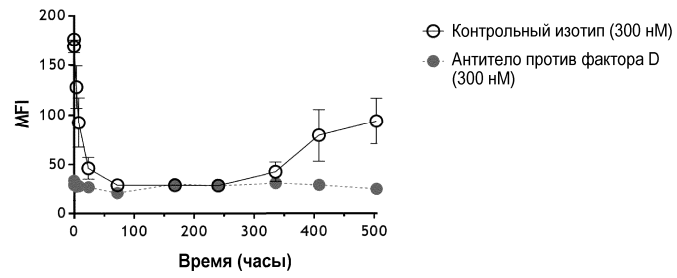
SEQ ID NO:23 = а.к. остатки 667-678 MASP-3

Фиг. 67



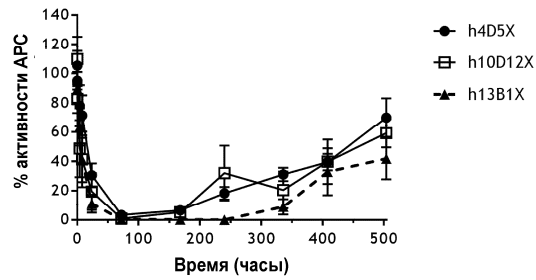
Фиг. 68

h13B1X-обработанные животные



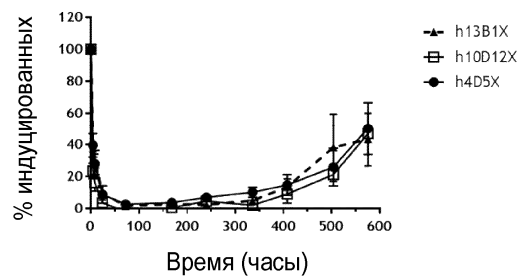
Фиг. 69

Осаждение Bb на зимозане



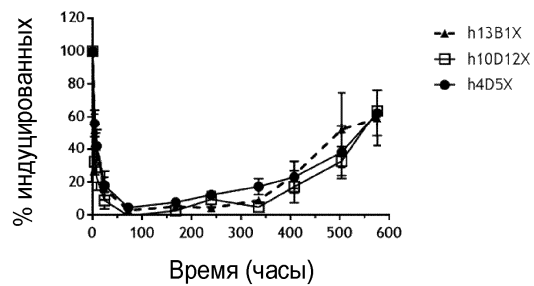
Фиг. 70

Жидкофазный Va



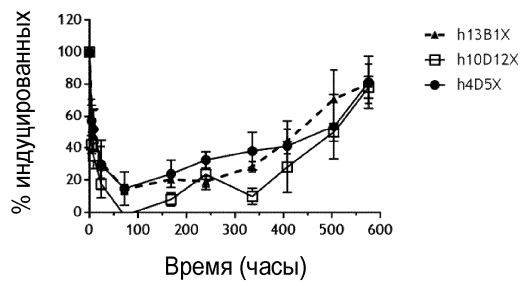
Фиг. 71А

Жидкофазный Bb

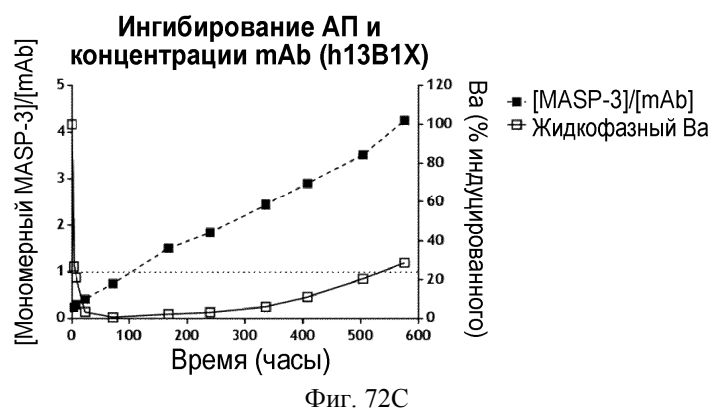
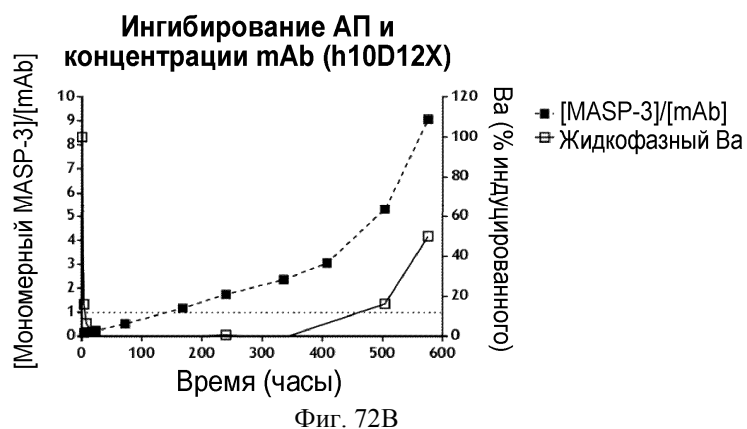
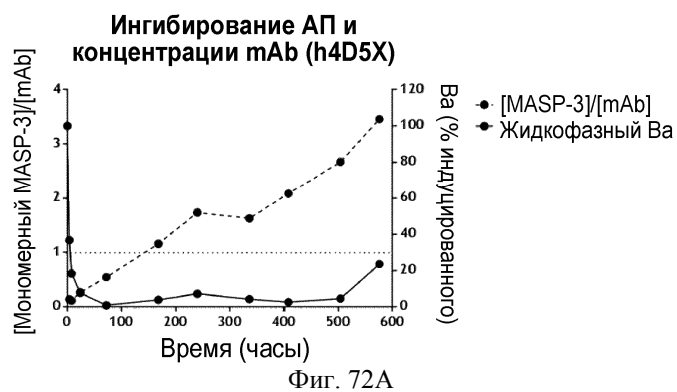


Фиг. 71В

Жидкофазный C3a



Фиг. 71С



Анализ на про-Df/зрелый Df в сыворотке обезьян, обработанных 13B1X

