(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202193189 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.11

(22) Дата подачи заявки
2020.05.21

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ ПАРАПРОТЕИНЕМИЧЕСКИХ НЕЙРОПАТИЙ

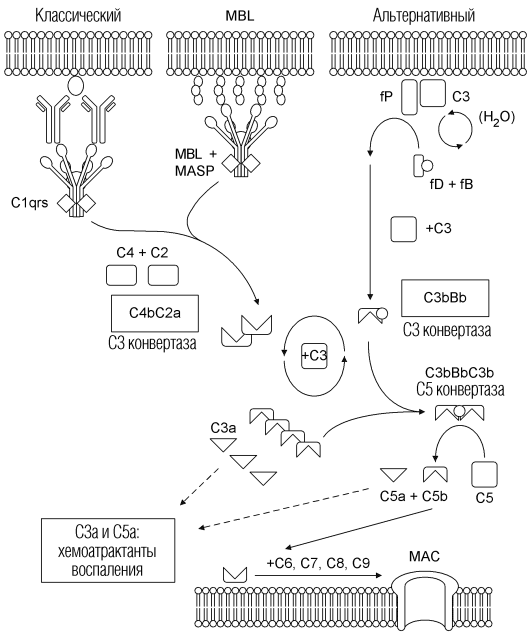
(31) **1907153.9**
(32) **2019.05.21**
(33) **GB**
(86) **PCT/EP2020/064234**
(87) **WO 2020/234432 2020.11.26**

(71) Заявитель:
АРДЖЕНКС БВБА (BE)

(72) Изобретатель:
Бланхетот Кристоф (BE), Баддинг Кевин (NL), Хак Эрик (NL), Силанс Карен, Ван Дер Валле Инге (BE), Ван Дер Пол Людо, Боросс Петер (NL)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способу лечения парапротеинемической нейропатии у субъекта путем введения субъекту антагониста системы комплемента. Антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5. Более конкретно, антагонистом может быть антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который блокирует или ингибирует систему комплемента путем ингибирования домена C2b фактора комплемента C2. Парапротеинемические нейропатии, которые можно лечить, включают, в частности, мультифокальную моторную нейропатию (MMN), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP) и синдром Гийена-Барре (GBS).



202193189 A1

202193189 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571649EA/025

АНТАГОНИСТЫ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ ПАРАПРОТЕИНЕМИЧЕСКИХ НЕЙРОПАТИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам лечения парапротеинемических нейропатий с использованием антагонистов системы комплемента. Антагонисты блокируют или ингибируют систему комплемента выше фактора комплемента C5. Парапротеинемические нейропатии, которые можно лечить, включают, в частности, мультифокальную моторную нейропатию (MMN), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP) и синдром Гийена-Барре (GBS).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента является важным аспектом врожденной иммунной системы, которая усиливает (дополняет) способность антител и фагоцитарных клеток очищать организм от микробных вторжений и поврежденных клеток. Таким образом, комплемент является жизненно важной линией защиты от инфекции.

Ответ на инфекцию должен быть быстрым и достаточно всесторонним, чтобы предотвратить риск для хозяина, но достаточно избирательным, чтобы избежать повреждения здоровых клеток. Комплемент обычно достигает этого тонкого баланса, используя многоуровневую и строго регулируемую каскадную систему из более чем 30 растворимых и экспрессируемых на поверхности белков. Факторы комплемента циркулируют в крови в виде не активных белков-предшественников. Активация системы приводит к системе активации, в котором один фактор активирует следующий за счет специфического протеолиза белка комплемента, расположенного ниже по ходу системы. Эта система может в конечном итоге привести к: продуцированию анафилатоксинов, которые привлекают и активируют макрофаги и лейкоциты; формированию литического мембраноатакующего комплекса (MAC); и опсонизации мишеней для фагоцитоза и разрушения.

Активация системы комплемента может происходить тремя путями: классическим путем; лектиновым путем; и альтернативным путем (см. фиг. 1). Каждый путь активирует центральный компонент, C3, что приводит к активации общего пути терминации, ведущего к образованию MAC (Muller-Eberhrd, Annu Rev Biochem 1988, 57:321). Классический путь часто называют антителозависимым, поскольку он сильно инициируется кластерами IgM или IgG. Этот путь обычно активируется, когда гексамерный C1q связывается с участками Fc молекул IgG или IgM, которые присутствуют в комплексе антитело/антиген. После связывания C1s расщепляет C4 с образованием C4a и C4b. Затем C2 связывается с поверхностно-связанным C4b (в присутствии Mg^{2+}) с образованием комплекса C4bC2, который затем расщепляется активированными C1s на два фрагмента: меньший 30 кДа фрагмент C2b и больший 70 кДа фрагмент C2a, который остается прикрепленным к C4b с образованием конвертазы C3

классического пути C4bC2a. Конвертаза C3 способна расщеплять C3 на C3a (анафилатоксин; усиливает воспаление) и C3b, тем самым инициируя амплификацию и нижестоящие эффекторные функции.

Активация лектинового пути опосредуется связыванием манноза-связывающих лектинов (MBL) или фиколинов с бактериальными углеводными мотивами, экспрессируемыми на поверхности патогенов или микробов. Связывание MBL впоследствии стимулирует активацию MBL-ассоциированной серинпротеиназы-1 (MASP-1) и MASP-2, что приводит к расщеплению C4 и C2, что приводит к образованию конвертазы C3 лектинового пути C4bC2a.

Альтернативный путь можно рассматривать как петлю амплификации, которая задействуется независимо от первоначального триггера. C3b напрямую связывается с мишенями на поверхности клеток микробов, инородного материала или поврежденной ткани. поверхностно-связанный C3b может затем связывать фактор B с образованием C3bB. Этот комплекс в присутствии фактора D расщепляется на Ba и Bb. Bb остается связанным с C3b с образованием C3bBb, который является конвертазой альтернативного пути C3.

Таким образом, эти три пути сходятся в центральных конвертазах C3. Конвертазы C3, C4bC2a или C3bBb образуют мультимерные комплексы с дополнительными молекулами C3b, давая конвертазы C5, C4bC2aC3b и C3bBbC3b, соответственно. Эти ферменты предпочтительно расщепляют фактор комплемента C5, высвобождая C5a (анафилатоксин; усиливает воспаление) и фрагмент C5b. C5b рекрутирует и ассоциируется с C6 и C7; комплекс внедряется в клеточные мембраны и взаимодействует с C8; который индуцирует связывание множества единиц молекул C9 с образованием мембраноатакующего комплекса C5b-9 (MAC) или растворимого терминальной системы комплемента (TCC). MAC образует поры, внедряясь в клеточные мембраны, что приводит в основном к лизису клеток без ядра (например, старых эритроцитов и некоторых грамотрицательных бактерий). Однако, на ядросодержащих клетках, образование MAC жестко регулируется, и его литическому эффекту можно противодействовать с помощью ионных насосов. Более того, сублитические уровни MAC могут вызывать повреждение или активацию клеток-хозяев и действовать как провоспалительный медиатор. В дополнение к MAC-опосредованным эффектам системы, анафилатоксины C3a и C5a действуют как мощные иммуномодуляторы, рекрутируя иммунные клетки к месту активации. Опсонины, C3b и C4b, также могут связываться с различными рецепторами комплемента и опосредовать удаление иммунных комплексов, фагоцитоз или стимуляцию B-клеточных ответов.

Система комплемента дополнительно контролируется рядом регуляторных белков комплемента. Они включают C1-ингибитор, который ингибирует стадии инициации классического и лектинового путей; фактор H, который диссоциирует C3 конвертазу; фактор I, который разрушает C4b и C3b; и белки плазмы витронектин и кластерин и мембранный белок CD59, который ингибирует образование MAC (Sahu et al, Immunol Res

1998, 17:109; Campbell at al, Annu Rev Immunol 1988, 6:161).

Пока комплемент образует жизненно важную линию защиты от патогенных организмов, если его не контролировать должным образом, эти защитные функции могут действовать против клеток-хозяев и вызывать или обострять иммунные, воспалительные и дегенеративные состояния. Когда комплемент гиперактивируется, как это происходит при аутоиммунных заболеваниях или у субъектов с дисфункциональными регуляторными белками, он вызывает тяжелую воспалительную реакцию во многих органах (Noris and Remuzzi, Semin Nephrol 2013, 33(6): 479-492). Учитывая повсеместную экспрессию белков комплемента по всему телу, считается, что система комплемента может играть роль во многих заболеваниях с иммунным компонентом, таких как воспалительные заболевания, дегенеративные заболевания, рак и отторжение трансплантата. Система комплемента также все чаще участвует в заболеваниях центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера (Carpanini et al, Front Immunol 2019, 10:362).

Уникальное положение комплемента и как исходного детектора чужеродного или поврежденного материала, и как нижестоящего организатора иммунных ответов делает комплемент привлекательной терапевтической мишенью. Действительно, в настоящее время сообщается о программах клинической разработки ингибиторов против более чем дюжины различных мишеней комплемента.

Было продуцировано несколько растворимых ингибиторов комплемента. C1-INH (различные производители) в настоящее время одобрен для лечения наследственного ангионевротического отека и оценивается при других нарушениях, таких как сепсис и ишемия-реперфузия. Однако, C1-INH является широким ингибитором сериновой протеазы, который блокирует инициирующие протеазы как классического, так и лектинового путей, а также не-комплементарные протеазы систем коагуляции и контакта. Напротив, сутимлимаб (также известный как BIVV009, ранее TNT009) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое разработано для избирательного ингибирования классического пути активации комплемента через нацеливание на C1s и показало себя многообещающим при лечении гемолитической анемии и болезни холодовых агглютининов. Также были разработаны другие антитела, которые ингибируют ключевые белки в системе. Annexon разработал моноклональное антитело (ANX005), действующее на уровне C1q для нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний, в то время как Omeros разработала моноклональное антитело против MASP-2 (OMS721) в качестве клинического кандидата для лечения атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS).

На противоположном конце системы комплемента действует экулизумаб (Soliris®), анти-C5антитело, которое в настоящее время одобрено для использования при лечении пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) и aHUS. Это антитело связывает сайт на C5, который предотвращает его активацию конвертазами C5, тем самым нарушая высвобождение C5a и образование MAC. Было также оценено анти-C5a антитело (IFX-1), а также ряд низкомолекулярных антагонистов C5aR1 (PMX53; PMX205; CCX186),

которые оказались многообещающими в качестве потенциальных средств лечения различных нарушений.

Также были разработаны антитела для таргетирования белка C2 системы комплемента. Международная патентная заявка № WO2014/189378 описывает связывающие молекулы, например антитела, со свойствами ингибирования специфической активности C2. Такие связывающие молекулы описаны как полезные при лечении симптомов различных заболеваний человека, таких как воспалительное заболевание или ишемия-реперфузия.

Несмотря на значительные усилия по разработке терапевтических агентов, нацеленных на систему комплемента, клинический успех ингибиторов комплемента остается ограниченным. Вероятно, это связано со сложной природой системы комплемента. Остается необходимость лучше понять роль сверхактивной активности комплемента при различных нарушениях, чтобы разработать эффективные способы лечения, основанные на ингибировании комплемента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что таргетирование системы комплемента выше фактора комплемента C5, вероятно, будет эффективной стратегией при лечении парапротеинемических нейропатий, особенно таких нейропатий, как мультифокальная моторная нейропатия (MMN), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP) и синдром Гийена-Барре (GBS). Парапротеинемические нейропатии представляют собой периферические нейропатии, характеризующиеся присутствием «парапротеинов» в сыворотке крови. Парапротеины представляют собой моноклональные антитела или иммуноглобулины определенного типа, которые в относительном избытке продуцируются аномальной клональной пролиферацией B-лимфоцитов или плазматических клеток. В отличие от нормальных иммуноглобулиновых антител, парапротеины обычно не могут бороться с инфекцией.

Как сообщается и проиллюстрировано здесь, система комплемента играет важную роль в патологии парапротеинемических нейропатий. В частности, было обнаружено, что сыворотки пациентов с MMN, CIDP и GBS активируют комплемент посредством опсонизации как шванновских клеток, так и мотонейронов in vitro. Важно отметить, что результаты, представленные в настоящем документе, дополнительно демонстрируют, что шванновские клетки и мотонейроны экспрессируют высокие уровни регуляторного белка комплемента CD59, фактора, который предотвращает терминальную полимеризацию мембраноатакующего комплекса (MAC). Результаты также показывают, что шванновские клетки устойчивы к лизису, опосредованному комплементом. Взятое вместе, это указывает на то, что при парапротеинемических нейропатиях существует защита от лизиса, опосредованного комплементом, и что наблюдаемая патология, вероятно, не зависит от MAC, то есть вызвана белками комплемента, расположенными выше MAC. Соответственно, настоящее изобретение направлено на лечение парапротеинемических нейропатий через таргетирование системы комплемента выше фактора комплемента C5.

В первом аспекте, настоящее изобретение представляет способ лечения парапротеинемической нейропатии у субъекта, где способ включает введение субъекту антагониста системы комплемента, при этом антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5. Настоящее изобретение также относится к антагонисту системы комплемента для применения при лечении парапротеинемической нейропатии у субъекта, где антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует классический путь активации комплемента и/или лектиновый путь активации комплемента.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемической нейропатией является демиелинизирующая нейропатия.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется присутствием иммуноглобулинов IgM, IgA или IgG.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител. Аутоантителами могут быть иммуноглобулины класса IgM, IgA или IgG.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител против нейронального антигена. Нейрональным антигеном может быть ганглиозид, или нейрональным антигеном может быть миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG). Для вариантов осуществления, в которых нейрональным антигеном является ганглиозид, ганглиозид может быть выбран из GM1, GM1b, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GT3 и GQ1b. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, ганглиозидом является GM1.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия выбрана из: мультифокальной моторной нейропатии (MMN), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Гийена-Барре (GBS), синдрома Миллера Фишера, острой моторной аксональной нейропатии (AMAN), острой моторной и сенсорной аксональной нейропатии (AMSAN), синдром хронической атаксической нейропатии-офтальмоплегии-IgM с антителами к парапротеину-холодовым агглютининам-дисиалозилу (CANOMAD), дистальной приобретенной демиелинизирующей симметричной (DADS) нейропатии, периферической нейропатии, ассоциированной с моноклональной гаммапатией, анти-MAG-синдрома и периферической нейропатии. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, парапротеинемической нейропатией является мультифокальная моторная нейропатия (MMN), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP) или синдром Гийена-Барре (GBS). Парапротеинемической нейропатией предпочтительно является мультифокальная моторная нейропатия (MMN).

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C3. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует C1, C1q, C1r или C1s. В некоторых вариантах осуществления,

антагонист ингибирует фактор комплемента C2, C2a или C2b. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C3, C3a или C3b. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C4, C4a или C4b.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист выбран из: видов ингибирующей РНК, например киРНК или кшРНК; низкомолекулярного ингибитора; биологического антагонисат, например ингибирующего пептида или миметика антитела, такого как аффитело, аффилин, аффитин, аднектин, атример, эвазин, дарпины, антикалин, авимер, финомер, версателo или дуокалин; или его антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист выбран из: компстатина Cp40 (Amyndas); PEG-Cp40 (Amyndas); AMY-101 (Amyndas); AMY-201 (Amyndas); APL-1 и APL-2 (Apellis); Синриза (Shire); CDX-1135 (Celldex); APT070 Микрокоцепта (MRC); HC3-1496 (InCode); нафамостата (Torii Pharmaceutical) и белка контроля комплемента вируса осповакцины (VCP).

В предпочтительных вариантах осуществления, антагонистом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент выбран из: вариабельного домена легкой цепи (VL) антитела, вариабельного домена тяжелой цепи (VH) антитела, одноцепочечного антитела (scFv), фрагмента $F(ab')_2$, фрагмента Fab, фрагмента Fd, фрагмента Fv, неполного (моновалентного) антитела, диател, триател, тетрател, унител, доменных антител и нанотел.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C1, C1q, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a или C4b.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбран из: сутимлимаба (Bioverativ); ANX005 (Annexon); mAb H17 (Elusys Therapeutics); и TNT003 (True North).

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C2. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом C2b фактора комплемента C2.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 [EDDHDAFAY];

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG];

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 [DYNMD];

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 [QHSRELPYT];

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 [LASNLKS]; и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 [RASKSVRTSGYNYMH].

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере 70% идентичность с ней, и домен VL, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере 70% идентичность с ней. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и домен VL, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту IVIg.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту ритуксимаба.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фигуре 1** схематически показан каскад клеточной сигнализации, вовлеченный в классический, лектиновый и альтернативный пути активации системы комплемента.

На **фигуре 2** показан профиль экспрессии различных мембранных белков на живых шванновских клетках (sNF02.2). Шванновские клетки окрашивают на различные мембранные белки, в частности белки, ассоциированные с системой комплемента, с использованием анализа проточной цитометрией. На семи графиках показано следующее: (A) CD46, (B) CD55, (C) CD59, (D) CD64, (E) CD88, (F) GM1 и (G) MAG.

На **фигуре 3** показан профиль экспрессии CRP на шванновских клетках sNF02.2 с или без обработки фосфолипазой-C (PL-C). sNF02.2 шванновские клетки обрабатывают различными концентрациями PL-C (1-0,5-0,25 Ед/мл) и инкубируют в течение 1 часа при 37°C перед окрашиванием антителами, обнаруживающими CD46 (A), CD55 (B) и CD59 (C), соответственно.

На **фигуре 4** показана устойчивость шванновских клеток (sNF96.2) к лизису, опосредованному комплементом. На каждом из графиков с фигуры 4 показано «без обработки PL-C» в левой половине графика и «обработка PL-C» в правой половине графика.

(A) Обработка PL-C снижает экспрессию как CD59, так и CD55 за счет отщепления

якоря GPI. Экспрессия CD46, который является трансмембранным белком, не изменилась (правая ось y). PL-C также не влияет на экспрессию GM1 (левая ось Y, панель A).

(B) Клетки внутренне защищены от фиксации C3. Фиксация C3 наблюдается в отсутствие опсонизации сывороткой пациента с MMN, и фиксация C3 была немного увеличена после опсонизации сывороткой пациента с MMN. Клетки, обработанные PL-C, более восприимчивы к фиксации C3, особенно после опсонизации. ARGX-117 ингибирует фиксацию C3, хотя после опсонизации и обработки PL-C наблюдается только частичное ингибирование. Предположительно, это связано с объединенной плотностью опсонизации анти-GM1 антител и сывороточных антител, направленных на другие эпитопы.

(C) Подобные результаты, как показано на панели B, наблюдают при количественной оценке фиксации MAC.

(D) Шванновские клетки защищены от лизиса клеток, опосредованного комплементом, что связано с высоким уровнем экспрессии CD59. Клетки, не обработанные PL-C, остаются жизнеспособными после опсонизации и инкубации с сывороткой, активной в отношении комплемента. После обработки PL-C наблюдают лизис клеток, когда шванновские клетки опсонизированы полученными от пациента анти-GM1антителами. ARGX-117 ингибирует это до исходного уровня.

На **фигуре 5** показана фиксация C3 комплемента на шванновских клетках sNF02.2 с помощью анти-HLA mAb. Клетки опсонизируют возрастающими концентрациями W6/32 (анти-HLA антитела) перед добавлением HPS (объединенная сыворотка человека) для активации пути активации комплемента. И EDTA, и TNT009 (480 мкг/мл) добавляют для оценки специфичности комплемента.

На **фигуре 6** показана экспрессия GM1 и связывание IgM на шванновских клетках. (A) sNF02.2 шванновские клетки окрашивают CTb для обнаружения экспрессии GM1 с помощью проточной цитометрии. (B) Определение проточной цитометрией связывания IgM с культивированными шванновскими клетками sNF02.2 после опсонизации сывороткой пациента MMN (заштрихованные столбцы) или без активации комплемента (белые столбцы).

На **фигуре 7** показано связывание IgM в сыворотке MMN-пациента с шванновскими клетками sNF02.2. Шванновские клетки опсонизируют различными образцами пациентов, содержащими различные титры GM1, и все они показали связывание IgM при инкубации с клетками sNF02.2. (A) MFI окрашивания IgM (B) Доля IgM-положительных шванновских клеток.

На **фигуре 8** показана оптимизация фиксации C3 на шванновских клетках sNF02.2 после опсонизации сывороткой пациента с MMN. 50000 шванновских клеток высевают в 96-луночные планшеты и опсонизируют сывороткой пациента с MMN (1 час, КТ). Каждый из графиков на фиг. 8 показывает «отсутствие опсонизации» в левой половине графика и «опсонизацию» в правой половине графика. (A) Комплемент активирован с использованием различных долей активной сыворотки комплемента: 10% (левый график), 5% (средний график) или 2,5% (правый график). Исследована сыворотка с активным

комплементом (черные столбцы) и очищенная сыворотка (= сыворотка с активным комплементом, предварительно инкубированная с шванновскими клетками) (серые столбцы). (B) Сводка результатов, изображенных на (A), при сравнении сыворотки (черные столбцы) и очищенной сыворотки (светло-серые столбцы). (C) Фиксация C3 на шванновских клетках с использованием различных антител для обнаружения C3: C3 FITC (LSBio, клон 6C9) (левый график), C3-BIO (LSBio, клон 6C9) + стрептавидин APC (средний график) или C3-BIO (поликлональный анти-человеческий C3 овцы) + стрептавидин APC (правый график). Клетки активируют 10% (черные столбцы) или 5% (серые столбцы) сывороткой. Белые полосы представляют собой контрольные образцы с EDTA, и все они соответствуют ожиданиям.

На **фигуре 9** показана зависимость активации комплемента от C2 в шванновских клетках. Шванновские клетки высевают в 96-луночные планшеты и опсонизируют сывороткой пациента с MMN (MMN-005) (1 час, КТ) с последующей инкубацией с C2-обедненной сывороткой, дополненной увеличивающимися концентрациями rhC2, начиная с 1,11 мкг/мл до 30 мкг/мл (физиологическая концентрация). Через 1 час (37°C) фиксацию C3 измеряют с помощью проточной цитометрии после окрашивания C3-BIO (LSBio, клон 6C9).

На **фигуре 10** показано дозозависимое ингибирование фиксации C3 на шванновских клетках sNF02.2, опсонизированных сывороткой пациента с MMN с помощью ARGX-117. Шванновские клетки переносят в 96-луночный планшет (50000 клеток/лунку), опсонизируют сывороткой пациента с MMN (1 час, КТ) и затем инкубируют с 5% сывороткой, активной к комплементу, которую предварительно инкубируют с антителами, блокирующими комплемент, или EDTA (20 мин, КТ). Обнаружение C3-фиксации выполняют путем окрашивания шванновских клеток с помощью C3-BIO (LSBio, клон 6C9) и стрептавидином-APC. (A) Фиксация C3 на шванновских клетках по значениям MFI APC. (B) Доля ингибирования фиксации C3 на шванновских клетках, рассчитанная с использованием 5% сыворотки, установленной при нулевом % ингибирования, и 10 мМ EDTA, установленной как 100% ингибирование.

На **фигуре 11** показана секреция цитокинов шванновскими клетками sNF02.2 после активации комплемента, индуцированной сывороткой MMN. Шванновские клетки высевают в 24-луночные планшеты, опсонизируют сывороткой пациента с MMN (1 час, КТ) и добавляют активную сыворотку комплемента в присутствии или в отсутствие антител, блокирующих комплемент. Через 48 часов супернатант собирают, и секрецию цитокинов измеряют с использованием платформы Luminex. Три графика показывают следующее: (A) IL-6, (B) IL-8 и (C) MCP-1. На каждом из графиков с фигуры 11 столбцы показаны в следующем порядке (слева направо): без стимуляции, IL-1b 10 нг/мл, IL-1b 5 нг/мл, IL-1b 2,5 нг/мл, TNF-a 50 нг/мл, TNF-a 25 нг/мл, TNF-a 12,5 нг/мл, только сыворотка, только MMN-05, MMN-05+сыворотка, MMN-05+сыворотка MgEGTA, MMN-05+сыворотка ARGX -117, MMN-05+сыворотка TNT009, MMN-05+сыворотка Экулизумаб, MMN-05+сыворотка HI, только MMN-73, MMN-73+сыворотка, MMN-

73+сыворотка MgEGTA, MMN-73+сыворотка ARGX-117 , MMN-73+сыворотка+TNT009, MMN-73+сыворотка Экулизумаб, MMN-73+сыворотка HI.

На **фигуре 12** показан предполагаемый механизм событий комплемента, запускаемых анти-GM1 аутоантителами, присутствующими у пациентов с MMN.

На **фигуре 13** показана экспрессия мембранных белков комплемента, включая регуляторные белки комплемента (CRP) на фиксированных iPSC-MN. Индуцированные мотонейроны, полученные из плюрипотентных стволовых клеток (iPSC-MN), культивируют и фиксируют с использованием 4% PFA на покровных стеклах перед окрашиванием на маркеры экспрессии. MGV=средний уровень яркости.

На **фигуре 14** показана зависимость C2 от фиксации C3. Мотонейроны, происходящие от iPSC, опсонизируют сывороткой, обедненной C2, и восстанавливают с увеличивающимися концентрациями очищенного C2 человека (hC2) для оценки активации комплемента путем измерения фиксации C3. iPSC-MN культивируют в течение 3 дней перед фиксацией и затем окрашивают для обнаружения экспрессии GM1 и отложения C3. Изображения анализируют при 40-кратном увеличении и рассчитывают средний уровень яркости (MGV) для одного GM1, одного C3 или отношения между ними.

На **фигуре 15** показано, что ARGX-117 блокирует комплемент при других иммуноопосредованных нейропатиях. Сыворотки пациентов с GBS или CIPD используют для опсонизации двигательных нейронов в присутствии или в отсутствие ARGX-117 (200 мкг/мл). Мотонейроны, происходящие из iPSC, культивируют в течение 12-14 дней перед фиксацией и окрашивают для обнаружения экспрессии GM1 и отложения C3. Изображения анализируют при 40x увеличении и рассчитывают средний уровень яркости (MGV) для одного GM1, одного C3 или отношения между ними (C3/GM1). На каждом из графиков на фиг. 15 сравнивают «только сыворотку» (левая полоса), «сыворотку+EDTA» (средняя полоса) и «ARGX-117 200 мкг/мл» (правая полоса).

На **фигуре 16** показано влияние IVIg на фиксацию C3 с использованием iPSC-MN, опсонизированных образцом пациента с MMN. Мотонейроны, полученные из iPSC, культивируют в течение 12-14 дней перед фиксацией и затем окрашивают на экспрессию GM-1 и отложение C3. Тестируют две разные партии IVIg: GammaQuin и Nanogam, используемые в концентрации 50 мг/мл. Изображения анализируют при 40x увеличении и рассчитывают средний уровень яркости (MGV) для одного GM1, одного C3 или отношения между ними (C3/GM1). На каждом из графиков на фиг.16 показаны столбцы в следующем порядке (слева направо): только сыворотка, сыворотка+EDTA, GammaQuin опс., GammaQuin опс. + соед., GammaQuin соед., Nanogram опс., Nanogram опс. + соед., Nanogram соед..

На **Фигуре 17** показано анти-идиотипическое действие IVIg на связывание GM1 сыворотками пациентов с MMN. ELISA выполняют с использованием сывороток пациентов с MMN, MMN005 и MMN073. GM1 наносят в 96-луночном планшете, инкубируют с сывороткой пациентов с MMN с или без добавления 50 мкг/мл IVIg (2 партии: GammaQuin и Nanogam) перед обнаружением IgM с использованием антител

против человеческого IgM.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

А. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области, к которой относится изобретение. Без ограничения какого-либо термина, ниже представлены дополнительные пояснения некоторых из используемых в настоящем документе терминов.

«Парапротеинемическая нейропатия» - используемый в настоящем документе термин «парапротеинемическая нейропатия» или «PPN» описывает набор периферических нейропатий, характеризующихся присутствием гомогенного иммуноглобулина в сыворотке. Гомогенный иммуноглобулин известен как «парапротеин». Аномальная клональная пролиферация В-лимфоцитов или плазматических клеток, которая может происходить или не происходить в контексте гематологического злокачественного новообразования, продуцирует иммуноглобулины в избытке. Некоторые расстройства периферической нервной системы тесно связаны с наличием чрезмерного количества аномальных иммуноглобулинов в крови. PPN может быть вызвана взаимодействием антител со специфическими антигенными мишенями на периферических нервах или отложением иммуноглобулинов. Типовые парапротеинемические нейропатии, которые можно лечить в соответствии с изобретением, включают MMN, CIDP и GBS.

«Мультифокальная моторная нейропатия» - Мультифокальная моторная нейропатия или MMN является редким заболеванием с распространенностью около 0,6 на 100000 человек, причем мужчины поражаются чаще, чем женщины (соотношение 2,7:1) (Harschnitz et al., J Clin Immunol 2014, 34:112-119). MMN является хронической иммуноопосредованной нейропатией, характеризующейся асимметричной, преимущественно дистальной слабостью конечностей. Отличительным признаком заболевания является наличие многоочаговых блоков моторной проводимости, и у пациентов часто обнаруживаются высокие сывороточные уровни антител IgM против гликосфинголипида GM1, который в большом количестве экспрессируется в рядом с областями лимфатических узлов периферических нервов. Эти ауто-GM1 IgM антитела обладают свойствами активации комплемента и являются детерминантами тяжести заболевания (Vlam et al., Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2015, 25;2(4)). GM1 широко экспрессируется в периферических двигательных нервах и локализуется как в аксолемме, так и в миелине периферических нервов. GM1 выполняет несколько важных функций, необходимых для распространения потенциала действия и поддержания скорости проводимости. Наивысшая экспрессия GM1 обнаруживается в узле Ранвье и соседних параузлах, где он закрепляет калиевые каналы и кластеризует натриевые каналы для поддержания плотных контактов посредством паранодальной стабилизации. Более того, GM1 действует как модулятор рецепторов нейротрофических факторов, контролирующих

нейритогенез и апоптоз, и как часть многомолекулярных сборок в липидных рафтах при передаче сигналов через мембрану и транспортировке. Нарушение этих функций приводит к нарушению проводимости через паранодальные области. Анти-GM1 антитела IgM, присутствующие у пациентов с MMN, продуцируются активированными В-клетками (плазматическими клетками); однако механизм этой активации В-клеток еще не установлен.

«Синдром Гийена-Барре» - синдром Гийена-Барре или GBS имеет заболеваемость 0,81-1,89 случаев на 100000 человек, причем мужчины страдают чаще, чем женщины (соотношение 3:2) (Kieseier et al., Nature Reviews, 2018, 4:31). В 60-70% случаев первые симптомы GBS проявляются через 1-3 недели после острой инфекции, обычно инфекции верхних дыхательных путей или желудочно-кишечной инфекции. Начальными симптомами GBS обычно являются изменение ощущений или боли вместе со слабостью мышц, начиная с ступней и рук. Это часто распространяется на руки и верхнюю часть тела. Аутоантитела к различным ганглиозидам, обнаруженным в аксонах, используются для диагностики определенных подтипов GBS. Например, анти-GM1 и анти-GD1a антитела IgG обнаруживаются в сыворотке крови пациентов, страдающих острой моторной аксональной нейропатией (AMAN) и острой моторной и сенсорной аксональной нейропатией (AMSAN). Эти антитела связываются с узлами Ранвье, где они нарушают тонкую структурную организацию, отвечающую за кластеризацию натриевых каналов, что приводит к замедлению аксональной проводимости и потере функции. Альтернативно, антитела связываются с окончаниями мотонейрона, вызывая дегенерацию пресинаптического нейронального окончания.

«Хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия» - Хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия или CIDP является наиболее распространенной иммуноопосредованной нейропатией с зарегистрированной распространенностью 0,8-8,9 случаев на 100000 человек (Kieseier et al., Nature Reviews, 2018, 4:31). Мужчины болеют чаще, чем женщины (соотношение 2:1). CIDP тесно связана с GBS и считается хроническим аналогом острого заболевания. Наиболее частыми симптомами CIDP являются слабость, онемение и покалывание в ногах, руках, пальцах и кистях. Другие симптомы включают усталость, боль, проблемы с равновесием и нарушение способности ходить. Некоторые варианты CIDP проявляют аутоиммунитет против белков в узле Ранвье. Эти варианты составляют подгруппу воспалительных нейропатий с аутоантителами IgG4 против паранодальных белков нейрофацина-186, нейрофасцина-155, контактина-1 и caspr-1 (Querol et al., Nat Rev Neurol. 2017, 13(9):533-547). Эти белки играют ключевую роль в компартментализации миелинизированного аксона на узел, параузел и междоузлие. Компартментализация необходима для скачущей проводимости, поскольку она поддерживает сегрегацию потенциалзависимых натриевых и калиевых каналов, участвующих в передаче потенциалов действия. Нарушение этих областей может привести к замедлению или блокированию нервной проводимости.

«Антагонист системы комплемента» - в настоящем документе фраза «антагонист

системы комплемента» или «антагонист комплемента» относится к любому агенту, способному блокировать или ингибировать функцию фактора комплемента или компонента системы комплемента, тем самым подавляя или снижая активность комплемента. Антагонист системы комплемента может блокировать или ингибировать классический путь активации комплемента, лектиновый путь активации комплемента, альтернативный путь активации комплемента или любую их комбинацию. Предпочтительно, антагонист системы комплемента ингибирует классический путь активации комплемента и лектиновый путь активации комплемента, воздействуя на фактор комплемента, который является общим для обоих этих путей. Антагонист комплемента для применения в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5. Это означает, что антагонист ингибирует или снижает активность комплемента путем ингибирования любого компонента или фактора пути активации комплемента, предшествующего C5 в каскаде комплемента, т.е. антагонист не ингибирует непосредственно C5 или какие-либо факторы комплемента ниже C5. Например, антагонист может ингибировать функцию фактора комплемента C1, C2, C3 или C4 или любой их комбинации. Подавление функции фактора комплемента означает, что фактор комплемента не может выполнять свою роль в общей системе активации комплемента даже в присутствии его вышестоящего сигнала активации.

Антагонисты для использования в настоящем изобретении могут принимать форму любого подходящего агента и могут прямо или косвенно блокировать или ингибировать функцию фактора или компонента комплемента. Антагонист может ингибировать функцию своей мишени путем подавления экспрессии мишени, например, с помощью технологии киРНК. В этом отношении, подходящие антагонисты включают виды ингибирующих РНК, например миРНК или кшРНК. Антагонист может ингибировать функцию своей мишени, связываясь непосредственно с мишенью; например, антагонист может напрямую связываться со своей мишенью и препятствовать активации следующего фактора комплемента в системе. В предпочтительных вариантах осуществления, антагонист специфичен для своей мишени. Например, антагонист C2 будет предпочтительно ингибировать функцию C2 по сравнению с другими молекулярными мишенями. Антагонисты обычно достигают требуемого уровня специфичности путем непосредственного взаимодействия со своей мишенью, например, путем избирательного связывания с белком комплемента. Подходящие агенты, которые могут служить антагонистами для использования в описанных в настоящем документе способах, включают, но не ограничиваются ими: низкомолекулярные ингибиторы; и биологические антагонисты, включая ингибирующие пептиды, миметики антител, такие как аффитела, аффилины, аффитины, аднектины, атримеры, эвазины, дарпины, антикалины, авимеры, финомеры, версатела и дуокалины. В предпочтительных вариантах осуществления, антагонистами для использования в настоящем изобретении являются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

«Антитело» или **«иммуноглобулин» -** Используемый в настоящем документе термин «иммуноглобулин» включает полипептид, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он какой-либо соответствующей специфической иммунореактивностью. «Антитела» относятся к таким сборкам, которые обладают значительной известной специфической иммунореактивной активностью по отношению к представляющему интерес антигену. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи, с или без межцепочечной ковалентной связи между ними. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Общий термин «иммуноглобулин» включает пять различных классов антител, которые можно различить биохимически. Что касается IgG, иммуноглобулины включают две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации «Y», где легкие цепи соединяют тяжелые цепи, начиная с устья «Y» и продолжаясь через вариабельную область. Легкие цепи антитела классифицируются как каппа или лямбда (κ, λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью каппа или лямбда. В общем, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины создаются гибридомами, B-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи, аминокислотные последовательности идут от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца внизу каждой цепи. Специалистам в данной области техники будет понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ, μ, α, δ, ε) с некоторыми подклассами среди них (например, γ1-γ4). Природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы для специалиста в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Как указано выше, вариабельная область антитела позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть, VL домен и VH домен антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя определяющими комплементарность областями (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» также включает «VHH антитела» или «антитела, содержащие только тяжелые цепи».

«VHH-антитела» - Используемый в настоящем документе термин «VHH антитело» или «антитело, содержащее только тяжелые цепи» относится к типу антител, продуцируемых только видами семейства Camelidae , которое включает верблюдов, лам и альпак. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, или антитела к VHH состоят из двух тяжелых цепей и лишены легких цепей. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельный домен на N-конце, и эти вариабельные домены называются доменами «VHH», чтобы отличать их от вариабельных доменов тяжелых цепей обычных гетеротетрамерных антител, *m.e.* VH доменов, описанных выше.

«Вариабельная область» или «вариабельный домен» - термины «вариабельная область» и «вариабельный домен» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и имеют эквивалентное значение. Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов VH и VL сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его антигена-мишени. Однако, вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых «гипервариабельные петли», в каждом из VL домена и VH домена, которые образуют часть антигенсвязывающего сайта. Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи VLambda обозначаются в настоящем документе как L1(λ), L2(λ) и L3(λ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1(λ), состоящий из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2(λ), состоящий из 3 остатков) и 90-96 (L3(λ), состоящий из 5 остатков) в VL домене (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи VKappa обозначаются в настоящем документе как L1(κ), L2(κ) и L3(κ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1(κ), состоящий из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2(κ), состоящий из 3 остатков) и 90-97 (L3(κ), состоящий из 6 остатков) в VL домене (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли VH домена обозначаются в настоящем документе как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящий из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящий из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, сильно варьирующий по длине) в VH домене (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)).

Если не указано иное, термины L1, L2 и L3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям VL домена и охватывают гипервариабельные петли, полученные как из изотипов Vkappa, так и Vlambda. Термины H1, H2 и H3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям VH домена и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изотипов тяжелой цепи, включая γ, ε, δ, α или μ.

Каждая из гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может содержать часть «определяющей комплементарность области» или «CDR», как определено ниже. Термины «гипервариабельная петля» и «определяющая комплементарность область» не являются строго синонимичными, поскольку гипервариабельные петли (HV)

определяются на основе структуры, тогда как определяющие комплементарность области (CDR) определяются на основе вариабельности последовательности (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983), и пределы HV и CDR могут отличаться в некоторых VH и VL доменах.

CDR VL и VH доменов обычно можно определить как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельном домене легкой цепи, и остатки 31-35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельном домене тяжелой цепи; (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки в настоящем документе на «гипервариабельные петли» VH и VL доменов следует интерпретировать как также охватывающие соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное.

Более высококонсервативные части вариабельных доменов называют каркасной областью (FR), как определено ниже. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно), в значительной степени принимающих конфигурацию β-складок, соединенных тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR, и вместе с гипервариабельными петлями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., J. Mol. Biol, 215:175-182 (1990)). Несмотря на их высокую вариабельность последовательностей, пять из шести петель принимают лишь небольшой репертуар конформаций основной цепи, называемых «каноническими структурами». Эти конформации определяются, во-первых, длиной петель, а во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию через их упаковку, водородные связи или способность принимать необычные формы основной цепи.

«CDR» - используемый в настоящем документе термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» означает не непрерывные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в вариабельной области как тяжелой, так и легкой цепи полипептидов. Эти конкретные области были описаны Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из приведенных выше ссылок, приведены для сравнения. Предпочтительно термин «CDR» является CDR, как

определено Kabat на основании сравнений последовательностей.

Таблица 1: Определения CDR

	Определения CDR		
	Kabat[1]	Chothia[2]	MacCallum[3]
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

[1] Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat et al, выше

[2] Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia et al, выше

[3] Нумерация остатков соответствует номенклатуре MacCallum et al, выше.

«Каркасная область» - термин «каркасная область» или «FR область» в контексте настоящего описания включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Kabat). Следовательно, каркас вариабельной области имеет длину примерно 100-120 аминокислот, но включает только те аминокислоты, которые не входят в CDR. Для конкретного примера вариабельного домена тяжелой цепи и для CDR, как определено Kabat et al, каркасная область 1 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 1-30; каркасная область 2 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 66-94, и каркасная область 4 соответствует домену вариабельной области от аминокислоты 103 до конца вариабельной области. Каркасные области легкой цепи аналогично разделяются каждой из легких цепей CDR вариабельной области. Аналогичным образом, используя определение CDR Chothia et al. или McCallum et al., границы каркасной области разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления CDR определены по Kabat.

Во встречающихся в природе антителах, шесть CDR, присутствующие на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие не непрерывные последовательности аминокислот, которые специфически расположены для образования антигенсвязывающего сайта, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные вариабельные домены тяжелой и легкой цепи демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность в аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в значительной степени принимают β-листовую конформацию, и CDR образуют петли, которые соединяют и, в некоторых случаях, образуют часть β-листовую структуру. Таким образом, эти каркасные

области действуют, образуя каркас, который представляет правильную ориентацию шести CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий сайт, образованный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с иммунореактивным антигенным эпитопом. Положение CDR может легко определить специалист в данной области техники.

«Константная область» - Используемый в настоящем документе термин «константная область» относится к части антитела за пределами вариабельных доменов или вариабельных областей. Легкие цепи иммуноглобулина имеют однодоменную «константную область», обычно называемую «CL или CL1 доменом». Этот домен лежит на С-конце по отношению к VL домену. Тяжелые цепи иммуноглобулина отличаются по своей константной области в зависимости от класса иммуноглобулинов (γ, μ, α, δ, ε). Тяжелые цепи γ, α и δ имеют константную область, состоящую из трех доменов иммуноглобулина (называемых CH1, CH2 и CH3) с гибкой шарнирной областью, разделяющей домены CH1 и CH2. Тяжелые цепи μ и ε имеют константную область, состоящую из четырех доменов (CH1-CH4). Константные домены тяжелой цепи расположены на С-конце VH домена.

Нумерация аминокислот в тяжелой и легкой цепях иммуноглобулина проходит от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до С-конца в нижней части каждой цепи. Для определения константных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина используют разные схемы нумерации. В соответствии со схемой нумерации EU, константные домены тяжелой цепи молекулы IgG идентифицируются следующим образом: CH1 - аминокислотные остатки 118-215; CH2 - аминокислотные остатки 231-340; CH3 - аминокислотные остатки 341-446. В соответствии со схемой нумерации Kabat, константные домены тяжелой цепи молекулы IgG идентифицируются следующим образом: CH1 - аминокислотные остатки 114-223; CH2 - аминокислотные остатки 244-360; CH3 - аминокислотные остатки 361-477. «Fc домен» или «Fc область» обычно определяет часть константной области тяжелой цепи, включая домены CH2 и CH3. Fc область может также включать некоторые остатки из шарнирной области. «Шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит примерно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux K.H. et al. J. Immunol. 161:4083-90 1998). Антитела по изобретению, содержащие «полностью человеческую» шарнирную область, могут содержать одну из последовательностей шарнирной области, показанных в таблице 2 ниже.

Таблица 2: Последовательности петель человека

IgG	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP

	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 23)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 24)	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$ (SEQ ID NO: 25)	APELLGGP (SEQ ID NO:23)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO: 26)	CPSCP (SEQ ID NO: 27)	APEFLGGP (SEQ ID NO: 28)
IgG2	ERK (SEQ ID NO: 29)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:30)	APPVAGP (SEQ ID NO: 31)

«Фрагмент» - термин «фрагмент» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части или части антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого они были получены) за связывание антигена. Используемый в настоящем документе термин «фрагмент» молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например, вариабельный домен (VL) легкой цепи антитела, вариабельный домен (VH) тяжелой цепи антитела, одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент F(ab')2, фрагмент Fab, фрагмент Fd, фрагмент Fv, неполное (моновалентное) антитело, диатела, триатела, тетратела или любая антигенсвязывающая молекула, образованная комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в настоящем документе, также предназначен для охвата фрагментов антител, выбранных из группы, состоящей из юнител, доменных антител и нанотел. Фрагменты могут быть получены, например, посредством химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

«**Специфичность**» и «**Мультиспецифические антитела**» - Антитела для использования в описанных в настоящем документе способах связываются с антигенами-мишенями в системе комплемента. Предпочтительно, чтобы антитела «специфически связывались» со своим антигеном-мишенью, где термин «специфически связываться» относится к способности любого антитела предпочтительно иммунно взаимодействовать с данной мишенью, например, C1, C2, C3 или C4. Антитела могут быть моноспецифическими и содержать один или несколько сайтов связывания, которые специфически связываются с конкретной мишенью. Антитела могут быть включены в форматы «мультиспецифических антител», например биспецифические антитела, где мультиспецифические антитела связываются с двумя или несколькими антигенами-мишенями. Для достижения множественной специфичности, «мультиспецифические антитела» обычно конструируют так, чтобы включать различные комбинации или пары полипептидов тяжелой и легкой цепей с разными парами VH-VL. Мультиспецифические, особенно биспецифические антитела, могут быть сконструированы так, чтобы принять

общую конформацию нативного антитела, например Y-образного антитела, имеющего плечи Fab с различной специфичностью, конъюгированные с Fc областью. Альтернативно, мультиспецифические антитела, например биспецифические антитела, могут быть сконструированы так, чтобы принять не нативную конформацию, например, где вариабельные домены или пары вариабельных доменов, имеющие разные специфичности, расположены на противоположных концах Fc области.

«Модифицированное антитело» - Используемый в настоящем документе термин «модифицированное антитело» включает синтетические формы антител, которые изменены так, что они не встречаются в природе, например, антител, которые содержат, по меньшей мере, две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (например, антитела или мини-тела с удаленным доменом); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т. д.), измененные для связывания с двумя или несколькими разными антигенами или с разными эпитопами одного антигена); молекулы тяжелой цепи, присоединенные к молекулам scFv, и подобные. Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5,892,019. Кроме того, термин «модифицированное антитело» включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антител, которые связываются с тремя или несколькими копиями одного и того же антигена). В другом варианте осуществления, модифицированным антителом по изобретению является слитый белок, содержащий, по меньшей мере, одну часть тяжелой цепи, лишенную домена CH2, и содержащий связывающий домен полипептида, включающий связывающую часть одного члена пары рецепторных лигандов.

«Гуманизирующие замены» - в настоящем документе термин «гуманизирующие замены» относится к аминокислотным заменам, при которых аминокислотный остаток, присутствующий в конкретном положении в VH или VL домене антитела, заменяется аминокислотным остатком, который встречается в эквивалентном положении в эталонном VH или VL домене человека. Эталонным VH или VL доменом человека может быть VH или VL домен, кодируемый зародышевой линией человека. Гуманизирующие замены могут быть сделаны в каркасных областях и/или CDR антител, определенных в настоящем документе.

«Гуманизированные варианты» - в настоящем документе, термин «гуманизированный вариант» или «гуманизированное антитело» относится к варианту антитела, которое содержит одну или несколько «гуманизирующих замен» по сравнению с эталонным антителом, где часть эталонного антитела (например, VH домен и/или VL домен или его части, содержащие, по меньшей мере, одну CDR) имеют аминокислоту, полученную из вида, отличного от человека, и «гуманизирующие замены» происходят в аминокислотной последовательности, полученной из вида, отличного от человека.

«Модифицированные на уровне генов зародышевой линии варианты» - термин «модифицированный на уровне зародышевой линии вариант» или «модифицированные на уровне зародышевой линии антитела» используется в настоящем

документе для конкретного обозначения «гуманизированных вариантов», в которых «гуманизирующие замены» приводят к замене одного или нескольких аминокислотных остатков, присутствующих в (а) конкретных положениях в VH или VL домене антитела с аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном VH или VL домене человека, кодированном зародышевой линией человека. Типично, что для любого данного «модифицированного на уровне зародышевой линии варианта» заменяющие аминокислотные остатки, замененные *в* модифицированном на уровне зародышевой линии варианте, берутся исключительно или преимущественно из одного VH или VL домена, кодированного зародышевой линией человека. Термины «гуманизированный вариант» и «модифицированный на уровне зародышевой линии вариант» часто используют как синонимы. Введение одной или нескольких «гуманизирующих замен» в полученный из верблюжьих (например, ламы) VH или VL домен дает продуцирование «гуманизированного варианта» VH или VL домена, полученного из верблюжьих (ламы). Если замененные аминокислотные остатки получены преимущественно или исключительно из одной последовательности VH или VL домена, кодированной зародышевой линией человека, то результатом может быть «модифицированный на уровне зародышевой линии человека вариант» VH или VL домена, полученного из верблюжьих (ламы).

«Аффинные варианты» - В настоящем документе, термин «аффинный вариант» относится к варианту антитела, которое демонстрирует одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом, где аффинный вариант демонстрирует измененную аффинность к антигену-мишени по сравнению с эталонным антителом. Например, аффинные варианты будут демонстрировать измененную аффинность к мишени по сравнению с эталонным антителом. Предпочтительно, аффинный вариант будет демонстрировать *улучшенную* аффинность к антигену-мишени по сравнению с эталонным антителом. Аффинные варианты обычно демонстрируют одно или несколько изменений аминокислотной последовательности в CDR по сравнению с эталонным антителом. Такие замены могут привести к замене исходной аминокислоты, присутствующей в данном положении в CDR, другим аминокислотным остатком, который может быть встречающимся в природе аминокислотным остатком или не встречающимся в природе аминокислотным остатком. Аминокислотные замены могут быть консервативными или не консервативными.

«Субъект» - используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к млекопитающему, предпочтительно человеку. Субъектом может быть мужчина или женщина. Субъект может проявлять один или несколько симптомов, соответствующих парапротеинемической нейропатии. В некоторых вариантах осуществления, субъектом может быть пациент, где пациентом является индивидуум, который получает медицинскую помощь и/или активно обращается за медицинской помощью для лечения парапротеинемической нейропатии.

В. Методы лечения

В настоящем изобретении представлены способы лечения парапротеинемических нейропатий. Способы включают введение субъекту антагониста системы комплемента, где антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5. Настоящее изобретение также относится к антагонисту системы комплемента для использования при лечении парапротеинемической нейропатии, где антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5.

Парапротеинемические нейропатии определены в другом месте в данном документе и включают класс периферических нейропатий, характеризующихся присутствием гомогенного иммуноглобулина или «парапротеина» в сыворотке. Периферическими нейропатиями являются заболевания или дегенеративные состояния периферических нервов, при которых поражаются двигательные, сенсорные или вазомоторные нервные волокна. Особый интерес представляют иммуноопосредованные нейропатии, которые представляют собой класс заболеваний периферических нервов, вызванных иммуноопосредованным повреждением периферических нервов. Как правило, иммуноопосредованные периферические нейропатии характеризуются прогрессирующей мышечной слабостью и часто сопровождаются сенсорным дефицитом, таким как боль и онемение. Предполагается, что эти нарушения вызваны аутореактивными антителами в сыворотке, которые связываются с компонентами миелина или с белками, расположенными в узлах Ранвье. Общей чертой этих заболеваний является нарушение барьера «кровь-нерв» (BNB), что позволяет аутоантителам, компонентам комплемента и воспалительным клеткам получать доступ к эндоневрию нерва. Считается, что это разрушение BNB запускается циркулирующими цитокинами, такими как VEGF, TNFα и IL1-β, и металлопротеазами, секретируемыми Т-клетками. При попадании в нерв, аутоантитела могут связываться с нейрональными антигенами, такими как миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) или ганглиозиды, которые присутствуют на миелине или на соединении между аксонами, соответственно. Как объясняется в другом месте в данном документе, образование иммунных комплексов антитело/антиген может инициировать классический путь активации системы комплемента через рекрутинг C1q.

Парапротеинемические нейропатии представляют собой группу иммуноопосредованных нейропатий, характеризующихся избыточным содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови. PPN часто ассоциированы с присутствием аутоантител. Существующие стратегии лечения этого класса нейропатий в настоящее время включают внутривенный иммуноглобулин (IVIg), плазмаферез (плазмообмен), кортикостероиды, азатиоприн, ритуксимаб, хлорамбуцил, флударабин, мелфалан и другие (см. Rison and Beydoun. BMC Neurology. (2016) 16:13).

Как сообщается в данном документе, иммуноглобулины, присутствующие в сыворотке крови пациентов с различными парапротеинемическими нейропатиями, могут активировать комплемент, и это подтверждает роль комплемент-опосредованного повреждения ткани в патологии, наблюдаемой у пациентов с PPN. Однако предыдущее клиническое исследование экулизумаба (Soliris™ - анти-C5 антитело) в лечении

мультифокальной моторной нейропатии (MMN) не продемонстрировало эффективности (Fitzpatrick et al., J Peripher Nerv Syst, 2011, 16(2):84-91).

Важно отметить, что авторы настоящего изобретения показали, что как шванновские клетки, так и мотонейроны активируют регуляторный белок CD59 комплемента, белок, который защищает клетки от MAC-опосредованного лизиса. Это наблюдение указывает на то, что элементы системы комплемента выше C5 играют более важную роль в патологии PPN. Это вполне может объяснить недостаточную эффективность экулизумаба, наблюдаемую ранее. Не желая быть связанными теорией, считается, что активация комплемента при парапротеинемических нейропатиях вызывает высвобождение цитокинов и/или хемокинов посредством активации C3aR, который, как было обнаружено, экспрессируется на шванновских клетках и мотонейронах. Хемокины, такие как MCP-1, могут играть роль в привлечении воспалительных клеток, тем самым способствуя неврологическим повреждениям.

Настоящее изобретение направлено на улучшение лечения PPN путем воздействия на активность комплемента выше фактора комплемента C5.

Нейропатии, подлежащие лечению в соответствии с описанными в настоящем документе способами, включают все периферические нейропатии, классифицированные как «парапротеинемические нейропатии». Они включают как острые, так и хронические заболевания. Парапротеинемические нейропатии могут быть классифицированы как демиелинизирующие, аксональные или их комбинации, в зависимости от того, поврежден ли миелин и/или аксон. В некоторых вариантах осуществления, нейропатией, которую необходимо лечить, является аксональная нейропатия. В некоторых вариантах осуществления, нейропатией, которую необходимо лечить, является демиелинизирующая нейропатия, например, хроническая демиелинизирующая нейропатия.

Парапротеинемические нейропатии часто характеризуются наличием аутоантител. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, нейропатии, подлежащие лечению описанными в настоящем документе способами, характеризуются наличием аутоантител. Высокие титры сывороточных аутоантител, распознающих нейрональные антигены, встречаются при нескольких формах периферических сенсорных, моторных и сенсомоторных нейропатий. Антитела часто реагируют с гликозилированными молекулами клеточной поверхности, включая гликолипиды, гликопротеины и гликозаминогликаны, но описаны также антитела к внутриклеточным белкам. Существует несколько корреляций между специфичностью антител и клиническими симптомами, что позволяет предположить, что нейропатии могут быть вызваны антителами. Аутоантитела, обычно IgM или IgG изотипа, способны активировать классический путь системы комплемента на периферических нервах, как описано в другом месте в настоящем документе. Доступ к периферическим нервам для аутоантител и комплемента становится возможным после разрушения барьера «кровь-нерв» (BNB). В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется высоким титром аутоантител. В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия

характеризуется наличием аутоантител IgG, IgM или IgA.

В некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител против нейронального антигена. В некоторых вариантах осуществления, нейрональным антигеном является белок, расположенный в узлах Ранвье. В других вариантах осуществления, нейрональным антигеном является белок, расположенный на миелиновой оболочке. Миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) является составной частью миелина периферической и центральной нервной системы. Антитела IgM с высоким титром к MAG связаны с сенсомоторной демиелинизирующей периферической нейропатией. Антитела MAG обычно связаны с присутствием моноклонального белка IgM. В некоторых вариантах осуществления, нейрональным антигеном является миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG).

Ганглиозиды являются группой гликосфинголипидов, широко распространенных в мембранных компонентах нервной системы. В некоторых вариантах осуществления, нейрональным антигеном является ганглиозид. Ганглиозидами, наиболее часто распознаваемыми ассоциированными с нейропатией аутоантителами, являются GM1, GD1a, GD1b и GQ1b. В некоторых вариантах осуществления, ганглиозид выбран из GM1, GM1b, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GT3 и GQ1b. В предпочтительном варианте осуществления, ганглиозидом является GM1. Отдельные пациенты могут обладать антителами к одному или нескольким ганглиозидам. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител против одного или нескольких нейрональных антигенов. В некоторых вариантах осуществления, периферическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител против одного или нескольких ганглиозидов. В некоторых вариантах осуществления, нейрональным антигеном является паранодальный белок. В некоторых вариантах осуществления, нейрональным антигеном может быть параноидальный белок, выбранный из контактина 1, NF155, NF186 и NF140. Аутоантитела, о которых известно, что они ассоциированы с различными периферическими нейропатиями, описаны в таблице 3 ниже. Например, аутоантитела IgG4, направленные против паранодальных белков, были идентифицированы у пациентов с CIDP. Обнаружение антитела GM1, обычно изотипа IgM, ассоциировано с мультифокальной моторной нейропатией и нижней моторной нейропатией, характеризующейся мышечной слабостью и атрофией. GM1 IgM может присутствовать в виде моноклонального парапротеина IgM или в виде поликлонального IgM.

Таблица 3 . Аутоантитела при периферических нейропатиях

Заболевание	**Антигены**	**Изотип антител**
Подтип GBS		
AMAN	GM1, GM1b, GD1a	IgG
AMSAN	GM1, GD1a	IgG
Синдром Миллера-	GQ1b, GT1a	IgG

Фишера		
CIDP (и подтипы)	MAG, Контактин 1, NF155, NF186, NF140	IgG4
CANOMAD	GD3, GD1b, GT1b, GQ1b	IgM
DADS	MAG	IgM
MMN	GM1	IgM
Анти-MAG нейропатия	MAG	IgM
POEMS	неизвестный	IgG/IgA

Конкретные парапротеинемические нейропатии, подлежащие лечению в соответствии с описанными в настоящем документе способами, могут быть выбраны из мультифокальной моторной нейропатии (MMN), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Гийена-Барре (GBS), синдрома Миллера-Фишера, острой моторной аксональной нейропатии (AMAN), острой моторной и сенсорной аксональной нейропатии (AMSAN), синдрома хронической атаксической нейропатии-офтальмоплегии-IgM с антителами против парапротеина-холодовых агглютининов-дисиалозила (CANOMAD), дистальной приобретенной демиелинизирующей симметричной (DADS) нейропатии, периферической нейропатии, ассоциированной с моноклональной гаммопатией, анти-MAG периферической нейропатией и синдромом POEMS. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, парапротеинемическая нейропатия выбрана из мультифокальной моторной нейропатии (MMN), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Гийена-Барре (GBS). Описанные в настоящем документе способы особенно предпочтительны для лечения мультифокальной моторной нейропатии (MMN).

Описанные в настоящем документе способы предназначены для лечения парапротеинемической нейропатии у субъекта, нуждающегося в этом. Субъектом предпочтительно является человек. Субъектом может быть пациент, где пациентом является человек, который получает медицинскую помощь и/или активно обращается за медицинской помощью для лечения парапротеинемической нейропатии. Субъект, которого лечат, обычно проявляет один или несколько симптомов, соответствующих парапротеинемической нейропатии, включая, но не ограничиваясь ими: постепенное начало онемения; пощипывание или покалывание в ступнях или руках, которое может распространяться вверх на ноги и руки; острая, колющая, пульсирующая, леденящая или жгучая боль; чрезвычайная чувствительность к прикосновениям; нарушение координации и падения; подергивания и мышечные судороги; истончение (истощение) мышц; мышечная слабость или паралич. У субъекта, которого лечат, может быть ранее диагностирована парапротеинемическая нейропатия по любым стандартным критериям оценки. Субъект может быть идентифицирован или ему ранее был поставлен диагноз на основании избытка иммуноглобулинов в сыворотке. Альтернативно или дополнительно, субъект может обладать аутоантителами к одному или нескольким нервным антигенам.

Подлежащий лечению субъект может уже получать лечение парапротеинемической нейропатии или, возможно, ранее получал лечение парапротеинемической нейропатии. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получал или получает IVIg. В других вариантах осуществления, субъект ранее получал или получает ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления, субъект получал или получает плазмаферез. Субъект мог не реагировать на предыдущее лечение или у него могла развиться устойчивость к предыдущему лечению, в результате чего его симптомы ухудшились.

Описанные в настоящем документе способы лечения могут привести к полному или частичному исчезновению одного или нескольких симптомов, ассоциированных с PPN. Улучшение эффективности может быть измерено с использованием любых стандартных критериев оценки, подходящих для оценки лечения PPN.

Способы по настоящему изобретению могут включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов для лечения парапротеинемической нейропатии. Один или несколько дополнительных терапевтических агентов могут вводиться одновременно с антагонистом комплемента в качестве комбинированной терапии. Альтернативно, один или несколько дополнительных агентов могут вводиться до или после введения антагониста комплемента, т.е. агенты вводятся последовательно. Дополнительные терапевтические агенты, которые можно вводить в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, IVIg, ритуксимаб, кортикостероиды, азатиоприн, хлорамбуцил, флударабин, мелфалан, циклофосфамид/преднизон, мелфалан, габапентин, прегабалин, вальпроат, дектрометорфан, трамадол, дулоксетин, амитриптилин и венлафаксин.

C. Антагонисты комплемента

Представленные в настоящем документе результаты показывают, что конечные стадии системы комплемента, в частности лизис, опосредованный MAC, могут не играть существенной роли в патологии PPN. Это связано с тем, что шванновские клетки и мотонейроны экспрессируют высокие уровни регуляторного белка комплемента CD59, который защищает от лизиса, опосредованного MAC. Отсюда следует, что связанная с комплементом патология, связанная с парапротеинемическими нейропатиями, описанными в настоящем документе, может быть опосредована факторами выше C5, например, через C3aR. Таким образом, настоящее изобретение представляет способ лечения парапротеинемических нейропатий путем ингибирования пути активации комплемента выше C5.

Способы включают введение субъекту антагониста системы комплемента, при этом антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5. Антагонист, который ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5, не ингибирует непосредственно фактор комплемента C5 или любой из нижестоящих факторов (C6, C7, C8, C9), которые объединяются, чтобы сформировать мембраноатакующй комплекс. Вместо этого антагонист, который ингибирует систему

комплемента выше фактора комплемента C5, таргетирует фактор или компонент системы комплемента, предшествующего фактору комплемента C5. Факторы комплемента выше C5 включают C1, C2, C4 и C3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента путем ингибирования функции любого из C1, C2, C4 и C3. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента путем ингибирования функции любого из C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a или C4b.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C3. Факторы комплемента выше C3 включают C1, C4 и C2. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента через ингибирование функции любого из C1, C2 и C4. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует систему комплемента через ингибирование функции любого из C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C4, C4a или C4b.

Инициирующим фактором классического пути активации комплемента является фактор комплемента C1. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C1. В других вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C1q, C1r или C1s. Ингибируя каскад комплемента в факторе комплемента C1, можно предотвратить или уменьшить расщепление C1-специфических мишеней, C4 и C2, и специфически ингибировать активацию комплемента через классический путь активации системы комплемента. Ингибирование C1 может уменьшить отложение опсонина C4b, тем самым уменьшая таргетирование клеток для фагоцитоза и разрушения. Кроме того, ингибирование C1 может предотвратить или уменьшить образование C3 конвертазы, C4bC2a. C4 и C2 также могут расщепляться ферментами MASP через лектиновый путь; тем не менее, общие уровни C3 конвертазы могут все еще значительно ингибироваться таргетированием фактора комплемента C1.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор C4 комплемента. В других вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C4a или C4b. Таргетированием фактора комплемента C4 можно предотвратить образование C3 конвертазы, C4bC2a, и ингибировать активацию комплемента через классический и лектиновый пути активации системы комплемента.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C2. В других вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C2a или C2b. Ингибирование C2 также предотвращает или уменьшает образование C3 конвертазы, тем самым уменьшая отложение анафилатоксина C3a и опсонина C3b, а также других продуктов активации комплемента ниже C2. Антагонист C2 может непосредственно ингибировать C2a, предотвращая образование C3 конвертазы. Альтернативно, антагонист может ингибировать C2b, предотвращая начальное связывание C2 с поверхностно-связанным C4b. Антагонист C2b может оставлять связывание C2a с C4b нетронутым. Тем не менее, активность C2 может значительно ингибироваться

антагонистом C2b.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C3. В других вариантах осуществления, антагонист ингибирует фактор комплемента C3a или C3b. Ингибирование C3 может предотвратить или уменьшить образование C5 конвертазы, C3bBbC3b, тем самым уменьшая отложение анафилатоксина C5a и генератора MAC, C5b.

В зависимости от точки в каскаде комплемента, в которой антагонист ингибирует систему комплемента, антагонист может ингибировать классический путь активации комплемента, лектиновый путь активации комплемента, альтернативный путь активации комплемента или комбинацию этих путей. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует классический путь активации комплемента и лектиновый путь активации комплемента, но не влияет на альтернативный путь активации комплемента. Антагонисты, таргетирующие C2 и C4, способны ингибировать классический и лектиновый пути активации комплемента, оставляя нетронутым альтернативный путь. В некоторых случаях, может быть полезно оставить нетронутым один из путей комплемента, чтобы это важное звено врожденной иммунной системы не отключалось полностью. Альтернативно или дополнительно, антагонисту может потребоваться только частичное ингибирование активности комплемента для достижения терапевтического эффекта.

Антагонисты для использования в терапевтических способах, описанных в данном документе, ингибируют факторы или компоненты системы комплемента выше фактора комплемента C5, чтобы ингибировать или снижать активность комплемента. Как сообщается в данном документе, полезно таргетировать систему комплемента выше C5, чтобы ингибировать активность факторов комплемента, которые предшествуют образованию комплекса MAC. Антагонисты для применения в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут снижать или ингибировать активность комплемента путем ингибирования образования биологически активных пептидов, производных от комплемента, таких как C4a, C4b, C3a, C3b и C5a. Антагонист может предотвращать, по меньшей мере частично, повреждающее действие пептидов, производных от комплемента, на клетки и ткани. Антагонист системы комплемента может ингибировать или снижать активность комплемента за счет уменьшения отложения анафилатоксинов, за счет уменьшения отложения опсонинов, за счет уменьшения продуцирования или секреции цитокинов и/или хемокинов, за счет уменьшения фагоцитоза, за счет уменьшения рекрутинга иммунных клеток и любой их комбинации них. В некоторых вариантах осуществления, антагонист системы комплемента ингибирует отложение анафилатоксинов. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует отложение C3a или C5a. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует отложение опсонинов. В некоторых вариантах осуществления, антагонист ингибирует отложение C3b или C4b. В некоторых вариантах осуществления, антагонист подавляет продуцирование и/или секрецию воспалительных цитокинов и/или хемокинов.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист подавляет продуцирование и/или секрецию MCP-1.

Антагонистом для использования в настоящем изобретении может быть любой агент, способный ингибировать функцию фактора комплемента, тем самым ингибируя или снижая активность комплемента. Как отмечено в другом месте в данном документе, предпочтительно, чтобы антагонисты для использования в способах проявляли специфичность в отношении своей мишени. Эта специфичность обычно достигается за счет связывания антагониста непосредственно со своей мишенью и ингибирования функции мишени.

В некоторых вариантах осуществления, антагонист выбран из: видов ингибиторной РНК, например киРНК или кшРНК; низкомолекулярных ингибиторов; биологических антагонистов, включая ингибирующие пептиды, миметики антител, такие как аффитела, аффилины, аффитины, аднектины, атримеры, эвазины, дарпины, антикалины, авимеры, финомеры, версатела и дуокалины; антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В предпочтительных вариантах осуществления, антагонистом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C1, C1q, C1s, C1r, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a или C4b. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C1, C1q, C1s, C1r, C2, C2a, C2b, C4, C4a или C4b. В предпочтительных вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2, предпочтительно с C2b.

Антитела и антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в данном документе, предназначены для терапевтического использования человеком и, следовательно, обычно относятся к типу IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, часто к типу IgG, и в этом случае они могут принадлежат к любому из четырех подклассов IgG1, IgG2a и b, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления, антителами являются антитела IgG, необязательно антитела IgG1. Антитела могут быть моноклональными, поликлональными, мультиспецифическими (например, биспецифическими антителами) антителами при условии, что они проявляют соответствующую иммунологическую специфичность для своей мишени. Моноклональные антитела предпочтительны, поскольку они высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта.

Описанные в настоящем документе антигенсвязывающие фрагменты обычно включают часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающий или вариабельный домен. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')2, биспецифические Fab и Fv, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. (см. Holliger and Hudson (2005) Nature Biotechnol. 23:1126-36, включенный в настоящий документе посредством ссылки).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты для использования в соответствии с описанными в настоящем документе способами могут проявлять высокую гомологию к человеку. Такие молекулы антител, имеющие высокую гомологию к человеку, могут включать антитела, содержащие домены VH и VL нативных не человеческих антител, которые демонстрируют достаточно высокий % идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления, молекулами антител являются гуманизированные или модифицированные на уровне генов зародышевой линии варианты не человеческих антител.

В неограничивающих вариантах осуществления, антитела могут содержать CH1 домены и/или CL домены (из тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно), аминокислотная последовательность которых полностью или по существу является человеческой. Для молекул антитела, предназначенных для терапевтического использования человеком, типично, что вся константная область антитела или, по меньшей мере, ее часть, имеет полностью или по существу аминокислотную последовательность человека. Следовательно, одна или несколько или любая комбинация CH1 домена, шарнирной области, CH2 домена, CH3 домена и CL домена (и CH4 домена, если он присутствует) могут быть полностью или по существу человеческими по отношению к его аминокислотной последовательности. CH1 домен, шарнирная область, CH2 домен, CH3 домен и/или CL домен (и/или CH4 домен, если он присутствует) могут происходить из антитела человека, предпочтительно, антитела IgG человека, более предпочтительно, антитела IgG1 человека подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Преимущественно, все из CH1 домена, шарнирной области, CH2 домена, CH3 домена и CL домена (и CH4 домена, если он присутствует) могут иметь полностью или по существу аминокислотные последовательности человека. В контексте константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин «по существу человеческий» относится к идентичности аминокислотной последовательности на, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 97%, или, по меньшей мере, 99% с постоянной областью человека. Термин «аминокислотная последовательность человека» в этом контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, реаранжированные и соматически мутированные гены.

В одном из вариантов осуществления, антитело или фрагмент антитела содержит Fc домен человека, который содержит одну или несколько мутаций, предназначенных для увеличения периода полужизни антитела или молекулы антитела в сыворотке. Такие усилия по оптимизации направлены на улучшение циркуляции антител in vivo. Примеры мутаций, влияющих на период полужизни в Fc домене IgG человека, включают His433Lys+Asn434Phe (NHance); Arg435His; Asn434Ala; Met252Tyr+Ser254Thr+Thr256Glu (YTE); Met428Leu +Asn434Ser (LS); Thr252Leu+Thr253Ser+Thr254Phe (LSF); Glu294delta+Thr307Pro+Asn434Tyr (C6A-66);

Thr256Asn+Ala378Val+Ser383Asn+Asn434Tyr (C6A-78); и Glu294delta (del). В зависимости от периода полужизни ингибитора комплемента в сыворотке, его можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз с интервалом от 1 дня до 1 месяца между последующими дозами.

В другом варианте осуществления Fc домен может содержать одну или несколько мутаций, направленных на нарушение эффекторной функции Fc домена. Такие мутации хорошо известны специалистам в данной области. В случае IgG1 человека, антитело может содержать Fc домен человека, который был модифицирован для отмены или нарушения его эффекторной функции. Такие мутации Fc домена обычно включают изменение, по меньшей мере, 1 аминокислоты из константной области тяжелой цепи в положении 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 или 322, тем самым вызывая изменение эффекторной функции при сохранении связывания с антигеном. Примеры мутаций, нарушающих эффектор в Fc домене IgG человека, включают Leu234Ala+Leu235Ala (обозначенную как LALA); Leu234Ala+Leu235Ala+Pro329Gly (обозначенную как LALA-PG); Ser228Pro+Leu235Glu в IgG4; Pro331Ser+Leu234Glu+Leu235Phe; и Pro331Ser+Leu234Ala+Leu235Ala.

Примеры антагонистов, подходящих для использования в настоящем изобретении, которые ингибируют фактор C1 комплемента, включают Цинрайз (Shire), сутимлимаб, также известный как TNT009 и BIV009 (Bioverativ), TNT003 (True North), ANX005 (Annexon) и нафамостат (Torii Pharmaceutical).

Примеры антагонистов, подходящих для использования в настоящем изобретении, которые ингибируют фактор C3 комплемента, включают компстатин Cp40 (Amyndas), PEG-Cp40 (Amyndas), AMY-101 (Amyndas), AMY-201 (Amyndas), APL-1 и APL-2. (Apellis), CDX-1135 (Celldex), APT070 Мирокоцепт (MRC), HC3-1496 (InCode), гуманизированное моноклональное антитело H17 (Elusys Therapeutics) или контрольный белок комплемента вируса осповакцины (VCP).

D. Анти-C2 антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Особенно предпочтительными антагонистами комплемента для использования в терапевтических способах, описанных в данном документе, являются такие, которые ингибируют фактор C2 комплемента. В предпочтительных вариантах осуществления, антагонистом комплемента для использования в лечении является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с C2. Подходящие анти-C2 антитела и антигенсвязывающие фрагменты для использования в описанных в настоящем документе способах включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты, идентифицированные в Международной патентной заявке № WO2014/189378, содержание которой полностью включено в настоящий документ.

C2 является гликопротеином 90-100 кДа, который участвует в классическом и лектиновом путях активации комплемента. Как описано выше, C2 может быть активирован C1 классического пути или активированным MASP2 лектинового пути. C2 связывается с поверхностно-связанным C4b (в присутствии Mg^{2+}) с образованием

комплекса C4bC2, который затем расщепляется активированными C1 или MASP2 на два фрагмента: более крупный 70 кДа фрагмент C2a, который остается прикрепленным к C4b с образованием C3 конвертазы C4bC2a, и N-концевой фрагмент C2b меньшего размера 30 кДа, который выделяется в жидкую фазу. После активации и связывания с C4b, C2a составляет каталитическую субъединицу C3 и C5 конвертаз, которые способны расщеплять C3 и C5, соответственно.

Аминокислотная последовательность C2 человека известна (номер доступа в GenBank NM_000063) и показана ниже как SEQ ID NO: 1.

Аминокислотная последовательность C2 человека (SEQ ID NO: 1):

MGPLMVLFCLLFLYPGLADSAPSCPQNVNISGGTFTLSHGWAPGSLLTYSCPQGL
YPSPASRLCKSSGQWQTPGATRSLSKAVCKPVRCPAPVSFENGIYTPRLGSYPVGGNVSF
ECEDGFILRGSPVRQCRPNGMWDGETAVCDNGAGHCPNPGISLGAVRTGFRFGHGDKV
RYRCSSNLVLTGSSERECQGNGVWSGTEPICRQPYSYDFPEDVAPALGTSFSHMLGATN
PTQKTKESLGRKIQIQRSGHLNLYLLLDCSQSVSENDFLIFKESASLMVDRIFSFEINVSVA
IITFASEPKVLMSVLNDNSRDMTEVISSLENANYKDHENGTGTNTYAALNSVYLMMNN
QMRLLGMETMAWQEIRHAIILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQKRNDYLDIYAI
GVGKLDVDWRELNELGSKKDGERHAFILQDTKALHQVFEHMLDVSKLTDTICGVGNM
SANASDQERTPWHVTIKPKSQETCRGALISDQWVLTAAHCFRDGNDHSLWRVNVGDPK
SQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKKNQGILEFYGDDIALLKLAQKVKMSTHARPICLPCTM
EANLALRRPQGSTCRDHENELLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMGVEWTSCAEVVSQ
EKTMFPNLTDVREVVTDQFLCSGTQEDESPCKGESGGAVFLERRFRFFQVGLVSWGLY
NPCLGSADKNSRKRAPRSKVPPPRDFHINLFRMQPWLRQHLGDVLNFLPL

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где VH и VL домены содержат последовательности CDR:

- HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 [EDDHDAFAY];
- HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG];
- HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 [DYNMD];
- LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 [QHSRELPYT];
- LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 [LASNLKS]; и
- LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 [RASKSVRTSGYNYMH].

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере, 90% или по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 8, и домен вариабельной легкой цепи (VL), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент,

который связывается с C2b, содержит домен вариабельной тяжелой цепи (домен VH), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 8, и домен вариабельной легкой цепи (домен VL), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где домен VH содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере, на 70%, при по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или по меньшей мере, на 95% идентичен SEQ ID NO: 8, и домен VL содержит последовательности CDR:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 [QHSRELPYT];

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 [LASNLKS]; и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 [RASKSVRTSGYNYMH].

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где домен VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и домен VL содержит последовательности CDR:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 [QHSRELPYT];

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 [LASNLKS]; и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 [RASKSVRTSGYNYMH].

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где домен VH содержит последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 [EDDHDAFAY];

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG];

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 [DYNMD], и домен VL содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или по меньшей мере, на 95%, идентичной SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с C2b и содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где домен VH содержит последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 [EDDHDAFAY];

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG];

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 [DYNMD], и домен VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

Для вариантов осуществления, в которых домены антител или антигенсвязывающих фрагментов определяются конкретной долей идентичности последовательности с эталонной последовательностью, VH и/или VL домены могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так что вариация присутствует только внутри каркасных

областей.

Таблица 4 Последовательности VH и VL доменов

Переменный домен	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATG QGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSL RSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSS	**8**
VL	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAAT YYCQHSRELPYTFGQGTKLEIK	**9**

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитела содержат CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и/или CH3 домен антитела человека, в частности IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG1 человека и включает замены L234A и L235A в CH2 домене, где положения определены в соответствии с нумерацией EU. Альтернативно или дополнительно, анти-C2b антитело содержит домен CH1, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен человеческого IgG1 и включает замены H433K и N434F в CH3 домене, где положения определены в соответствии с нумерацией EU. Нумерация EU относится к конвенции для Fc области, описанной в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 78-85 (1969); и Kabat et al., in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека и содержит замену S228P в шарнирном домене.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело включает CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека и содержит замену L445P в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека и содержит как замену S228P в шарнирном домене, так и замену L445P в CH3 домене.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека и содержит замены H433K и N434F в CH3 домене.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит CH1 домен, шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен IgG4 человека и содержит замену S228P в шарнирном домене и замены H433K и N434F в CH3 домене.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека. В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи состоит из константного домена тяжелой цепи IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 10 или 11.

В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи состоит из константного домена тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 12, 13 или 14.

Константные домены тяжелой цепи показаны в таблице 5 ниже.

Таблица 5 Константные домены тяжелой цепи

ID	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
IgG1 человека (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**10**
IgG1 человека LALA NHance (ARGX-117)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	**11**
IgG4 человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK	**12**

(UniProt)	PSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
IgG4 человека S228P L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**13**
IgG4 человека S228P NHance L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	**14**

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит или состоит из легкой цепи, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной показанной аминокислотной последовательности, показанной на SEQ ID NO: 20, и тяжелой цепи, выбранной из следующих:

(i) тяжелая цепь, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 15;

(ii) тяжелая цепь, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 16;

(iii) тяжелая цепь, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 17;

(iv) тяжелая цепь, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере,

97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 18; и

(v) тяжелая цепь, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% последовательности, идентичной с аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления, анти-C2b антитело содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-19.

В предпочтительном варианте осуществления, анти-C2b антитело содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Последовательности тяжелой и легкой цепей показаны в таблице 6 ниже.

Таблица 6 Тяжелые цепи и легкие цепи

ID	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
IgG1 человека (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**15**
IgG1 человека LALA NHance (ARGX-117)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	**16**

	VFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	
IgG4 человека (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	**17**
IgG4 человека S228P L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**18**
IgG4 человека S228P NHance L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	**19**
Легкая	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQ	**20**

цепь (ARGX-117)	KPGQPPKLLIYLASNLKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED AATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	

В предпочтительном варианте осуществления, анти-C2b антителом является моноклональное антитело IgG.

Для вариантов осуществления, в которых тяжелая и/или легкая цепи антител определяются по конкретной доле идентичности последовательности с эталонной последовательностью, тяжелая цепь и/или легкая цепь могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так что вариация присутствует только вне областей CDR.

Если в настоящей заявке не указано иное, % идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, и при этом аминокислотная последовательность, которую нужно сравнивать, может содержать добавления или делеции по отношению к эталонной последовательности, для оптимального выравнивания между этими двумя последовательностями. Доля идентичности рассчитывается путем определения количества идентичных положений, для которых аминокислотный остаток идентичен между двумя последовательностями, и делением этого количества идентичных положений на общее количество положений в окне сравнения и умножением полученного результата на 100, чтобы получить долю идентичности между этими двумя последовательностями. Например, можно использовать программу BLAST, «Последовательности BLAST 2» (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), где используемыми параметрами являются параметры по умолчанию (в частности, для параметров «штраф за внесение пропуска»: 5 и «штраф продолжение пропуска»: 2; выбранной матрицей является, например, матрица «BLOSUM 62», предложенная программой), и доля идентичности между двумя сравниваемыми последовательностями рассчитывается непосредственно программой.

Анти-C2 антитела можно модифицировать в Fc области для увеличения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn, предпочтительно FcRn человека. Повышенную аффинность связывания можно измерить при кислом pH (например, от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 6,0). Повышенную аффинность связывания также можно измерить при нейтральном pH (например, от приблизительно pH 6,9 до приблизительно pH 7,4). Под «повышенной аффинностью связывания» подразумевается повышенная аффинность связывания с FcRn по сравнению с аффинностью связывания не модифицированной Fc области. Обычно не модифицированная Fc область обладает аминокислотной последовательностью дикого

типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В таких вариантах осуществления, повышенная аффинность связывания с FcRn молекулы антитела, имеющей модифицированную Fc область, будет измеряться относительно аффинности связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа для FcRn, предпочтительно FcRn человека.

E. Фармацевтические композиции

Антагонисты, особенно антитела и антигенсвязывающие фрагменты, для использования в терапевтических способах, описанных в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций для введения субъекту.

Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными адъювантами и эксципиентами в соответствии с общепринятыми методами, такими как описанные в (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995). Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителям или эксципиентам, которые по своей природе нетоксичны. Примерами таких эксципиентов являются, но не ограничиваются ими, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Также можно использовать не водные наполнители, такие как жирные масла и этилолеат.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Примеры подходящих водных и не водных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и использования поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов можно обеспечить как процедурами стерилизации, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и подобных. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия. Также могут быть включены фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и подобные; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат,

альфа-токоферол и подобные; и (3) хелатирующие металл агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и подобные.

Фармацевтические композиции можно вводить любым подходящим способом введения. Например, введение может быть парентеральным, предпочтительно внутривенной (вв) или подкожной (пк) инъекцией или инфузией. Фразы «парентеральное введение» и «вводимый парентерально» в контексте настоящего описания означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенные, внутрибрюшинные, подкожные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, внутриглазничные, внутрисердечные, внутрикожные, транстрахеальные, подкожные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутриспинальные, эпидуральные и внутригрудинные инъекции и инфузии.

Включение посредством ссылки

Различные публикации цитируются в предшествующем описании и во всех следующих примерах, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Далее изобретение будет понято со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Пример 1 Ингибирование комплемента в модели мультифокальной моторной нейропатии (MMN) in vitro с использованием живых шванновских клеток

Шванновские клетки представляют собой секретирующие миелин глиальные клетки, которые спирально обвивают аксон периферической нервной системы, образуя миелиновую оболочку. Эти клетки прикреплены к аксонам с помощью белка GM1. Их наиболее важной функцией является миелинизация аксонов для увеличения скачущей проводимости нейронов, но они также способствуют выживанию нейронов и передаче сигналов. Дисфункция этих клеток вызывает демиелинизацию, приводящую к снижению передачи сигнала. Таким образом, шванновские клетки связаны с несколькими демиелинизирующими заболеваниями, такими как MMN. Существует линия шванновских клеток человека - sNF02.2 - ее получают из метастаз в легких, диагностированных как злокачественная опухоль оболочки периферического нерва, у пациента. Клетки создают из многочисленных пассажей первичного опухолевого материала в культуре до тех пор, пока они не сформируют гомогенную популяцию шванновских клеток, которая демонстрирует клональную морфологию, положительную для маркеров шванновских клеток S100 и p75. Эту клеточную линию, приобретенную у ATCC®, используют в описанных в настоящем документе экспериментах.

А. Способы

1.1 Протокол культивирования шванновских клеток

sNF02.2 (ATCC® CRL-2885™) или sNF96.2 (ATCC© CRL-2884) шванновские

клетки культивируют в среде DMEM, дополненной 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и дополненной 10% FCS при 37°C при 5% CO_2. Дважды в неделю, когда конфлюэнтность достигает >80%, клетки пассируют или используют в экспериментах. Среду отбрасывают, и клетки промывают 10 мл PBS. Для диссоциации клеток добавляют 3 мл (T75) или 5 мл (T175) раствора для отделения клеток Accutase (eBioscience™, Thermo Fischer Scientific; кат. № 00-455-56), и клетки инкубируют при 37°C в течение 5 мин, или пока клетки полностью не отсоединятся. Затем добавляют культуральную среду (7 мл к T75 и 10 мл к T175) и клетки переносят в 15 мл пробирки перед центрифугированием (125 x g, 10 мин). Осадки ресуспендируют в 5 мл культуральной среды и считают, используя трипановый синий, чтобы отличить жизнеспособные клетки от мертвых. Затем клетки доводят до желаемой концентрации и высевают в колбы для культивирования (10 мл в T75, 20 мл в T175) или используют в экспериментах FACS.

1.2 Протокол окрашивания шванновских клеток

Клетки культивируют, как описано выше, и после подсчета, 50000 клеток переносят в v-донный планшет. Клетки промывают один раз в буфере для FACS (PBS, 1% BSA, 0,01% азида натрия) и окрашивают соответствующими антителами, разведенными в буфере для FACS, в течение 45 минут на льду в темноте (см. таблицу 7 для антител, окрашивающих FAC). При необходимости, клетки промывают один раз, добавляя 100 мкл буфера FACS, с последующим 5 мин центрифугированием при 125 x g. Затем клетки инкубируют со вторичным антителом в течение 45 мин на льду в темноте. После инкубации добавляют 100 мкл буфера для FACS и клетки центрифугируют (5 мин при 125 x g). Наконец, осадок клеток ресуспендируют в 100 мкл буфера FACS и анализируют с использованием FACS Canto II и сопутствующего программного обеспечения.

Таблица 7 Окрашивающие FACS антитела

Антитело	**Метка/ Флуорохром**	**Компания**	**Кат №**	**Клон**
CD46	FITC	BD	555949	E4.3
IgG2a мыши	FITC	BioLegend	400207	MOPC-173
CD55	FITC	BioLegend	311306	JS11
IgG1 мыши	FITC	BD	556028	
CD59	APC	eBioscience	17-0596	OV9A2
IgG1 мыши	APC	Biolegend	400119	MOPC-21
CD64	AF647	Sony	2125060	10.1
IgG1 мыши	AF647	Biolegend	400155	MOPC-21
CD88 (C3aR)	PE	Biolegend	345804	hC3aRZ8
IgG2b мыши	PE	BD	555058	37-35
IgG2b мыши	PE	BD	559529	MCP-11
Субъединица B холерного токсина	AF488	Thermofisher	C34775	
анти-MAG кролика		Thermofisher	PA5-49646	
Анти-кроличье козы	AF488	Life technologies	A11070	
анти-RBC кролика		LSBio	LS-C347937	

C3	Biotin	LSBio	LS-C62849	6C9
C3	FITC	LSBio	LS-C62855	6C9
Анти-человеческое IgM F(ab)'2	FITC	SouthernBiotech	2022-02	
CD46	APC	Thermofisher	A15711	MEM-258
CD55	APC	Biolegend	311312	JS11
CD35	Alexa Fluor® 647	BD	565329	E11
CD11b	APC	Invitrogen	17-0118-42	ICRF44
CD11c	APC	BD	333144	
C3aR	APC	Biolegend	345805	hC3aRZ8
C5aR	FITC	GeneTex	GTX75734	P12/1
Стрептавидин	APC	eBioscience	17-4317-82	

1.3 Анализ активации комплемента на живых шванновских клетках

При оценке активации комплемента, 50000 клеток переносят в 96-луночные v-донные планшеты перед опсонизацией 20 мкл соответствующего опсонизирующего агента, разведенного в VB++ (1 час, КТ). Затем добавляют 100 мкл VB++ и центрифугируют образцы (5 мин при 125 x g). Затем супернатант отбрасывают, и клетки инкубируют в течение 1 часа при 37°C со 100 мкл комплемент-активной сыворотки (предварительно инкубированной с EDTA, MgEDTA или Abs, 15 мин, КТ). Затем клетки центрифугируют в течение 5 минут при 125 x g и супернатант отбрасывают. Затем проводят окрашивание для активации комплемента в соответствии с протоколом окрашивания, описанным выше.

1.4 Анализ секреции цитокинов

Клетки sNF02.2 культивируют, как описано выше. После обработки Accutase и подсчета клетки переносят в 24-луночный планшет при плотности 10000 клеток/лунку в 1 мл культуральной среды sNF02.2. Через 2 дня культуральную среду отбрасывают, и клетки опсонизируют 100 мкл инактивированной нагреванием сыворотки пациента с MMN в разведении 1:50 в VB++ в течение 1 ч при КТ. Затем к опсонизированным клеткам добавляют 100 мкл 15% комплемент-активной сыворотки (предварительно инкубированной с MgEGTA или антителами в течение 15 мин при КТ), с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. Затем к клеткам добавляют 300 мкл культуральной среды, что дает конечный объем 500 мкл на лунку. Через 24 часа и 48 часов собирают 200 мкл супернатанта для внутреннего анализа в мультиплексном профильном центре University Medical Centre in Utrecht (MC Utrecht).

B. Результаты

1.5 Экспрессия рецепторов комплемента живыми шванновскими клетками

Для исследования биологии MMN с использованием шванновских клеток оценивают экспрессию регуляторов комплемента. Поэтому шванновские клетки sNF02.2 культивируют и проводят окрашивание FACS на маркеры экспрессии. Результаты показаны на **фиг. 2** и суммированы в **таблице 8** ниже.

Таблица 8. Экспрессия регуляторных белков комплемента на шванновских

клетках sNF02.2.

Наименование	Маркер	Шванновские клетки
MCP	CD46	++
DAF	CD55	++
Протектин	CD59	+++
CR1	CD35	-
C5aR	CD88	-
C3aR		+
GM1		++
MAG		+
FcγRI	CD64	++

Эти результаты показывают, что регуляторные белки комплемента (CD46, CD55 и CD59) экспрессируются на шванновских клетках с высокой экспрессией ключевого регулятора терминального пути CD59. Высокая экспрессия CD59 на шванновских клетках предполагает, что лизис, опосредованный комплементом, ограничен в этих клетках, поскольку образование MAC ингибируется. Вместо этого воспаление индуцируется в нервном компартменте посредством передачи сигналов клетками. Кроме того, в шванновских клетках обнаружена экспрессия рецептора 1 Fcγ (CD64), ответственного за фагоцитозный клиренс. Обнаружение CR1 (CD35) не наблюдается, поскольку экспрессия CR1 на шванновских клетках происходит с началом миелинизации, и в этих культивируемых шванновских клетках sNF02.2 отсутствует миелин (Terenghi F et al., Neurology, 2004, 62: 666-668). C3aR демонстрирует только низкую экспрессию, а C5aR отсутствует. В заключение, шванновские клетки в высокой степени экспрессируют CD59, что предполагает сублитическое образование MAC, запускающее воспаление в нервном компартменте.

Чтобы исследовать чувствительность регуляторных белков комплемента (CRP) на шванновских клетках к лизису, опосредованному комплементом, клетки sNF02.2 обрабатывают различными концентрациями фосфолипазы-C (PL-C), которая отщепляет заякоренные гликозилфосфатидилинозитолом белки, включая CD59 (Fitzpatrick A, Mann C et al., J Peripher Nerv Syst, 2011, 16(2): 84-91). Результаты показаны на **фиг. 3** и демонстрируют, что как CD55, так и CD59 чувствительны к лизису, опосредованному комплементом, поскольку уровни экспрессии обоих CRP снижались после обработки PL-C.

1.6 Устойчивость шванновских клеток к лизису клеток, опосредованному комплементом

Предыдущие эксперименты показали высокую экспрессию CD59 и CD55 на шванновских клетках (sNF92.2 и sNF02.2). Чтобы исследовать функциональные последствия этой экспрессии, оценивают опосредованную анти-GM1 фиксацию C3 и

MAC на шванновских клетках sNF96.2 с CD59 и CD55 или без них. Также исследуют влияние активации комплемента на жизнеспособность клеток. С этой целью шванновские клетки культивируют и переносят в планшет с v-образным дном для дальнейшего экспериментального анализа. Обработку фосфолипазой C (PL-C) обычно используют для удаления GPI-связанных белков, таких как CD59 и CD55, с поверхности клетки. Действительно, обработка PL-C приводит к удалению CD59 и CD55, в то время как поверхностная экспрессия CD46 и GM1 остается неизменной (**фиг. 4A**). Чтобы оценить влияние обработки PL-C на чувствительность к фиксации C3 и MAC, шванновские клетки опсонизируют сывороткой пациента с MMN (1 час, КТ), содержащей анти-GM1 антитела, или вероналовым буфером (VB) в качестве контроля. Затем клетки инкубируют с 5% комплемент-активной сывороткой или с 5% комплемент-активной сывороткой, предварительно инкубированной с 480 мкг/мл ARGX-117 в течение 1 часа при 37°C. Наконец, фиксацию C3 и MAC определяют с использованием меченных биотином анти-C3 антител и MAC, соответственно, и окрашивают стрептавидином, конъюгированным с APC. Результаты представлены на **фиг. 4A** и показывают, что фиксация C3 немного увеличена после опсонизации сывороткой MMN-05 по сравнению с опсонизацией VB только в шванновских клетках, не обработанных PL-C. Однако ARGX-117 полностью ингибирует фиксацию C3 в обоих условиях. Активация комплемента, опосредованная классическим путем, в контроле VB предположительно вызывается антителами, присутствующими в комплемент-активной сыворотке (например, анти-HLA антителами). После обработки PL-C наблюдают повышенную фиксацию C3, и ARGX-117 действительно ингибирует фиксацию C3, индуцированную сывороткой MMN-005 на обработанных PL-C клетках, хотя и не полностью (**фиг. 4B**). В этом состоянии ожидается высокая плотность опсонизации, которая достигается за счет антител IgM, направленных против GM1, и антител IgM/IgG против не-GM1 мишеней, регулирующих сильную активацию комплемента из-за отсутствия mCRP. Аналогичные наблюдения сделаны для фиксации MAC, когда необработанные клетки демонстрируют низкие уровни фиксации MAC, которые также немного увеличиваются после опсонизации сывороткой MMN-005. Обработка PL-C приводит к усилению фиксации MAC после опсонизации сывороткой MMN-005, которая ингибируется ARGX-117 (**фиг. 4C**). Наконец, чтобы оценить индукцию опосредованной комплементом цитотоксичности (CDC), жизнеспособность измеряют путем окрашивания 7AAD в сочетании с аннексином-V, и дважды положительные клетки считают поздними апоптозными/мертвыми. CDC не обнаружен с использованием клеток, экспрессирующих нормальные уровни регуляторных белков комплемента, даже после опсонизации сывороткой MMN-005. Однако обработка PL-C увеличивает апоптоз в опсонизированных MMN-05 клетках, и добавление ARGX-117 приводит к полной защите от опосредованного комплементом лизиса клеток (**фиг. 4D**). В заключение, шванновские клетки внутренне защищены от лизиса, опосредованного комплементом, благодаря высоким уровням экспрессии CD59 и CD55. В отсутствие mCRP обнаружен CDC, который можно (частично) предотвратить с помощью ARGX-117.

1.7 Обнаружение активации комплемента с использованием шванновских клеток

Для исследования активации комплемента на живых шванновских клетках, клетки переносят в 96-луночный v-донный планшет (50000 клеток/лунку) и опсонизируют с анти-HLA антителом (W6/32 - BioLegend; Кат № 311402) в течение 30 мин при КТ. Затем к клеткам добавляют комплемент-активную сыворотку (предварительно инкубированную с EDTA, MgEGTA или TNT009, 15 мин, КТ) до конечной концентрации 5% сыворотки. После 1 ч инкубации (37°C) клетки переносят в 96-луночные v-донные планшеты и измеряют фиксацию C3 после окрашивания (45 мин, лед). Результаты представлены на **фиг.5**.

Эти результаты демонстрируют фиксацию C3 после активации комплемента 5% HPS (объединенная сыворотка человека). Более того, фиксация C3 является специфичной для комплемента, поскольку фиксация C3 снижается до базовых уровней при добавлении EDTA (10 мМ) или TNT009 (480 мг/мл). Более того, C3 также блокируется в присутствии MgEDTA, исключая, что это происходит преимущественно через альтернативный путь активации комплемента. Примечательно, что фиксация C3 не зависит от опсонизации W6/32.

1.8 Связывание аутоантител, полученных от пациента с MMN, с культивируемыми шванновскими клетками

Перед определением патогенности антител IgM к GM1 исследуют связывание этих антител с шванновскими клетками человека in vitro. С этой целью шванновские клетки sNF02.2 культивируют и переносят в 96-луночные круглодонные планшеты (50000 клеток/лунку) в 50 мкл культуральной среды sNF02.2. Затем клетки окрашивают холерным токсином B - AF488 для обнаружения экспрессии GM1. Результаты, представленные на **фиг. 6A,** показывают, что культивируемые in vitro шванновские клетки sNF0.2.2 человека экспрессируют GM1. Более того, инкубация с сывороткой пациента MMN (содержащей аутоантитела против GM1) приводит к более высокой экспрессии анти-GM1 и, что более важно, связывание IgM с шванновскими клетками обнаружено после опсонизации сывороткой пациента с MMN (**фиг. 6B**). Различные сыворотки пациентов с MMN исследуют с широким диапазоном титров антител анти-GM1 IgM, и все они демонстрируют связывание IgM с шванновскими клетками. Более того, титрующий эффект связывания IgM с шванновскими клетками обнаружен для всех исследованных сывороток пациентов (**фиг. 7**).

Затем оценивают активирующий комплемент потенциал анти-GM1 антител IgM пациента на шванновских клетках. С этой целью шванновские клетки sNF02.2 человека переносят в 96-луночный v-донный планшет (50000 клеток/лунке) и опсонизируют с сыворотками пациента с MMN (1 ч, КТ). Затем добавляют комплемент-активную сыворотку (1 час, 37°C) до обнаружения C3 с использованием FITC-конъюгированного антитела.

Сначала наблюдается только ограниченная фиксация C3 из-за неадекватного определения C3 с использованием используемых антител. Поэтому используют разные

подходы для увеличения определения C3 и снижения фоновой активации комплемента. Сначала протестируют различные процентные доли комплемент-активных сывороток (10%, 5% и 2,5%), и их предварительно инкубируют с 200 мкг/мл анти-C5 mAb (1 час, 37°C), чтобы предотвратить активацию концевого пути активации комплемента и, таким образом, предотвратить лизис шванновских клеток sNF02.2. Чтобы снизить фон комплемента, также тестируют состояние с очищенной сывороткой (= комплемент-активная сыворотка, инкубированная на шванновских клетках в течение 4 x 10 мин при 4°C для удаления антител в сыворотке).

Результаты, изображенные на **фиг. 8A** и **8B,** не показывают никакой разницы между комплемент-активной сывороткой (черные столбцы) и очищенной сывороткой (серые столбцы), что позволяет предположить, что антитела, все еще присутствующие в сыворотке, не способствуют активации комплемента и, следовательно, фиксации C3. EDTA (белые столбцы) используют в качестве контроля. Однако использование 5% активной сыворотки комплемента кажется оптимальным, поскольку интервал между отсутствием опсонизации и опсонизацией был наибольшим. Во-вторых, протестированы различные анти-C3 антитела, чтобы увеличить окно обнаружения. Результаты представлены на **фиг. 8C** и показывают улучшение окна от 10% до 25% при использовании биотинилированного анти-C3 (LSBio, клон 6C9) для обнаружения фиксации C3 на шванновских клетках.

Таким образом, оптимальное обнаружение фиксации C3 на шванновских клетках наблюдается, когда используется комплемент-активная сыворотка в конечной концентрации 5% и с биотинилированным антителом для обнаружения C3 от LSBio (клон 6C9). В заключение, фиксация C3 выявляется на шванновских клетках после опсонизации сывороткой пациента с MMN. Это указывает на то, что антитела IgM к GM1, присутствующие в сыворотке пациентов с MMN, могут активировать классический путь активации комплемента.

1.9 Зависимость от C2

Зависимость от C2 оценивают для подтверждения важности фактора комплемента C2 в патогенезе MMN. Шванновские клетки sNF02.2 опсонизируют сывороткой пациента с MMN и подвергают воздействию C2-обедненной сыворотки (Complement Technology; кат. № A312), восстановленной с увеличивающимися концентрациями рекомбинантного C2 человека, rhC2 (U-protein express; кат. №: C001, 1987) для оценки фиксации C3. Результаты показаны на **фиг. 9** и показывают, что одна только C2-обедненная сыворотка приводит к относительно высоким значениям средней интенсивности флуоресценции (MFI) - сигнал MFI был выше по сравнению с контролем EDTA, что приводит к небольшому экспериментальному окну. Независимо от этого, сыворотка, восстановленная с помощью 30 мкг/мл rhC2, восстанавливает фиксацию C3 на шванновских клетках до нормального уровня. Кроме того, C3 фиксация восстанавливается около 5-10 мкг/мл rhC2, что соответствует 20-40% от физиологических уровней C2. Эти результаты показывают, что низкие уровни C2 не приводят к фиксации C3 или активации комплемента.

1.10 Эффективность ARGX-117 в ингибировании фиксации C3 на sNF02.2 Шванновских клетках

Создают различные ингибирующие моноклональные антитела против факторов комплемента, и некоторые из них одобрены для клинического применения. Например, TNT009 (BIVV009) является гуманизированное антитело против C1s, которое специфически блокирует классический путь активации комплемента (Jäger U, D'Sa et al., Blood, 2019, 133(9): 893-901), тогда как OMS646 таргетирует MASP-2, тем самым блокируя лектиновый путь. Экулизумаб ингибирует C5 и, таким образом, блокирует отложение MAC, вызванное всеми тремя путями (Brodsky R, Young N et al., Blood, 2018, 111: 1840-1847).

ARGX-117 является моноклональное антитело, таргетирующее C2, и оно уникально, поскольку оно ингибирует классический и лектиновый пути, оставляя нетронутым альтернативный путь. Приведенные выше результаты демонстрируют, что аутоантитела IgM к GM1 в сыворотке от пациентов с MMN могут специфически связываться с шванновскими клетками sNF02.2. Более того, аутоантитела способны активировать каскад комплемента, приводящий к фиксации C3 на шванновских клетках. Действие ARGX-117 на фиксацию C3, опосредованную сыворотками MMN, изучают для оценки терапевтического потенциала этого антитела. С этой целью шванновские клетки культивируют и перенося в планшет с v-образным дном (50000 клеток/лунку), опсонизируют сывороткой пациента с MMN (1 час, КТ) и затем инкубируют с 5% активной сывороткой комплемента, которую предварительно инкубируют с антителами, блокирующими комплемент, или EDTA (20 мин, КТ). Обнаружение фиксации C3 выполняют путем окрашивания шванновских клеток с помощью C3-BIO (LSBio, клон 6C9) и стрептавидина-APC. Результаты показаны на **фиг.10**.

Результаты показывают, что фиксация C3 ингибируется дозозависимым образом обоими, ARGX-117 и TNT009. Однако, ингибирование обоих антител не достигает контроля EDTA. TNT009 может блокировать фиксацию C3 до 53 мкг/мл, в то время как для блокирования в такой же степени требуются более высокие концентрации ARGX-117 (160 мкг/мл). Важно отметить, что к клеткам не добавляют анти-C5, что ранее делалось для блокирования пути терминального комплемента, чтобы можно было обнаружить фиксацию C3. Неожиданно, клетки не были лизированы, что означает, что они внутренне защищены от лизиса, опосредованного комплементом, вероятно, из-за высокой экспрессии CD59 на шванновских клетках. В заключение, ARGX-117 способен блокировать фиксацию C3 на шванновских клетках дозозависимым образом, и эти клетки внутренне защищены от лизиса, опосредованного комплементом.

1.11 Анализ секреции цитокинов

Чтобы разгадать патофизиологию происхождения повреждения нервов у пациентов с MMN, измеряют продуцирование цитокинов, опосредованное комплементом. Шванновские клетки высевают в 24-луночные планшеты (10000 клеток/лунку), опсонизируют с сывороткой пациента с MMN (1 ч, КТ) и комплемент-активные

сыворотки добавляют в присутствии или в отсутствии антител, блокирующих комплемент. Через 48 часов супернатант собирают, и секрецию цитокинов измеряют с помощью платформы Luminex. Результаты показаны на **фиг. 11** и демонстрируют, что стимуляция шванновских клеток IL1-β или TNF-α приводит к повышенной секреции IL-6, IL-8 и MCP-1. В сыворотке пациентов с MMN не наблюдается повышение уровня IL-6 или IL-8. Тем не менее, уровни MCP-1 в клетках, инкубированных с сывороткой пациентов с MMN, увеличены в 2 раза по сравнению с контролем (**фиг. 11C**). Это увеличение можно заблокировать при добавлении ARGX-117 или TNT009, тогда как экулизумаб может только частично блокировать секрецию MCP-1.

MCP-1 играет важную роль в рекрутинге воспалительных иммунных клеток, моноцитов и макрофагов к месту инфекции и также участвует в патогенезе некоторых заболеваний, в том числе нейро-воспалительных процессов, которые характеризуются неврологической дегенерацией. Например, уровни MCP-1 в кровотоке увеличиваются при прогрессировании GBS (Orlikowski et al, J of neuroimmunol, 2003, 134 (118-27))). В заключение, MCP-1 вырабатывается шванновскими клетками sNF02.2 после опсонизации с сыворотками пациента с MMN и последующей активации комплемента. ARGX-117 способен блокировать продуцирование MCP-1.

C. Заключение

Регулирование системы комплемента оценивают с использованием шванновских клеток sNF02.2. Данные демонстрируют, что шванновские клетки экспрессируют высокие уровни регуляторных белков комплемента CD46, CD55 и CD59. Более того, показано, что антитела IgM к GM1 от пациентов с MMN активируют классический путь активации комплемента, и что фиксация C3 зависит от присутствия C2 в исследуемой системе модели MMN. ARGX-117 эффективно блокирует активацию комплемента на клетках sNF02.2, сенсибилизированных анти-GM1 антителами.

Эти результаты позволяют предположить, что новый механизм, с помощью которого события, запущенные анти-GM1 аутоантителами способствуют патологии у пациентов с MMN. Это схематически изображено на **фиг. 12**. IgM анти-GM1 аутоантитела активируют классический путь активации комплемента, но из-за высокой экспрессии CD59 на шванновских клетках, литический MAC не образуется. Поэтому прямая комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) является маловероятным механизмом, который способствует неврологическому повреждению в этом состоянии. Тем не менее, было описано, что образование суб-литического MAC комплекса вызывает активацию клеток, которая может индуцировать продуцирование и секрецию воспалительных медиаторов. В настоящее исследовании наблюдается комплемент-зависимое продуцирование хемокина MCP-1 клетками sNF02.2. Экулизумаб, анти-C5, не способен ингибировать секрецию MCP-1 в одной из двух тестированных сывороток MMN, что позволяет предположить, что секреция MCP-1 клетками sNF02.2 инициируется механизмами формирования выше суб-литического образования MAC.

Вероятно, что активация комплемента анти-GM1 антителами вызывает

высвобождение цитокинов и/или хемокинов через C3aR, который, как было обнаружено, экспрессируется на этих клетках. Эти хемокины, такие как MCP-1, могут играть роль в привлечении воспалительных клеток, что приводит к дальнейшей дисфункции и повреждению нейронов. В настоящем документе, активация комплемента анти-GM1 антителами на шванновских клеток приводит к секреции MCP-1, которая ингибируется ARGX-117, что указывает на возможный терапевтический механизм этого антитела. В заключение, патофизиология деструкции нервов и демиелинизации у пациентов с MMN, по-видимому, имеет место до образования MAC, что делает компоненты системы комплемента выше MAC более интересными терапевтическими мишенями для лечения этого заболевания. ARGX-117 таргетирует белок комплемента C2 и, таким образом, является примером подходящей молекулы для лечения этого показания.

Пример 2 Ингибирование комплемента в модели мультифокальной моторной нейропатии (MMN) in vitro с использованием фиксированных шванновских клеток

A. Методы

2.1 Протокол культивирования и фиксации шванновских клеток на покровных стеклах

Шванновские клетки культивируют в среде DMEM дополненной 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, и с добавлением 10% FCS при 37°C в 5% CO_2. Два раза в неделю, когда конфлюэнтность достигает >80%, клетки пассируют или используют в экспериментах. Среду отбрасывают, и клетки промывают 10 мл PBS. Для диссоциации клеток, добавляют 3 мл (T75) или 5 мл (T175) раствора для открепления клеток Accutase, и клетки инкубируют при 37°C в течение 5 мин, или до тех пор, пока клетки полностью не отсоединятся. Затем добавляют культуральную среду (7 мл к T75 и 10 мл к T175), и клетки переносят в 15 мл пробирки перед центрифугированием (125 x g, 10 мин). Лепешки повторно суспендируют в 5 мл культуральной среды и подсчитывают с помощью трипанового синего, чтобы отличить жизнеспособные клетки от мертвых клеток. Затем клетки доводят до нужной концентрации и высевают в колбы с культурой (10 мл в T75, 20 мл в T175) или высевают на покровные стекла, которые помещают в 24-луночные планшеты.

2.2 Протокол оценки ARGX-117 in vitro

sNF02.2 шванновские клетки культивируют в течение 3 -х дней на покровных стеклах при 37°C, 5% CO_2. Клетки фиксируют с использованием 4% PFA, (10 мин при 4°C), промывают один раз 500 мкл PBS и покровные стекла удаляют из 24-луночных планшетов. Для минимизации неспецифического окрашивания, клетки гасят с помощью 100 мкл NH_4Cl в течение 5 мин при КТ, промывают один раз 100 мкл PBS с последующим блокированием с 100 мкл PBS+2% BSA в течение 2 ч при КТ. После промывки 100 мкл PBS клетки инкубируют по нисходящей с инактивированной нагреванием сывороткой пациента MMN, разведенной в соотношении 1:50 в PBS+2% BSA, в течение 60 мин. Затем клетки промывают один раз (500 мкл PBS+2% BSA), инкубируют по возрастающей с 15% комплемент-активной сыворотки (-/+ предварительная инкубация с антителами,

блокирующими комплемент) в течение 30 мин при КТ и промывают один раз (100 мкл PBS+2% BSA). Затем клетки окрашивают 100 мкл первичных антител (разведенных в PBS+2% BSA) и инкубируют по нисходящей (1 ч, КТ, темнота) до промывки 100 мкл PBS+2% BSA. Затем клетки инкубируют по нисходящей с 100 мкл стрептавидина-APC (1:100 разведенного в PBS+2% BSA) в течение 1 ч при КТ в темноте с последующим промыванием один раз 100 мкл PBS и один раз 100 мкл MilliQ водой. После сушки на покровных стекол на ткани, 7 мкл ProLong™ Diamond Antifade Mountant с DAPI пипетируют на покровные стекла, сушат в течение ночи при 4°C, затем фиксируют лаком для ногтей. Клетки анализируют с помощью микроскопа Zeiss Z1 со светодиодами Colibri со следующими параметрами: 40x увеличение, 25% LED, 400 мс для Alexa Fluor™ 488 канала, 100 мс для APC канала и 50 мс для DAPI канала. Антитела, используемые для окрашивания, показаны в таблице 9 ниже.

Таблица 9 Окрашивающие антитела

Антитело	**Метка/ Флуорохром**	**Компания**	**Кат. №**	**Коэффициент увеличения**
Поликлональное анти-человеческое C4 козы	Биотин	MyBioSource	MBS560216	1:100
Поликлональное анти-человеческое C3[(1)] овцы	Биотин	MyBioSource	MBS560642	1:100
Анти-C5b-9 [(2)]	Биотин	Novus Bio	NBP2-23494	1:500
Стрептавидин	APC	ThermoFisher eBioscience™	17-4317-82	1:100
Подъединица B холерного токсина	Alexa Fluor™ 488	ThermoFisher	C34775	1:500
Анти-человеческий C3 клон 9	Биотин	Sanquin	MW1830	1:100
Анти-человеческий C3 клон 28	Биотин	Sanquin	MW1860	1:100
μ-цепь анти-человеческого IgM козы	Биотин	Sigma Aldrich	B1265	1:300
CD46	APC	ThermoFisher	A157711	1:50
CD55	APC	BioLegend	311312	1:25
CD59	APC	Life technologies	17-0596-42	1:50
Анти-мышиное IgG козы	AF647	Invitrogen	A21235	1:400
GM1	AF488	Invitrogen	C34775	1:500

(1) Взаимодействует и cC3a, и с C3b человека.

(2) Анти-C5b-9 клон aE11 направлен против неоэпитопа, экспонированного на C9, при включении в TCC.

B. Результаты

Для экспериментов, проводимых с использованием фиксированных шванновских клеток, наблюдают результаты, очень похожие на те, которые описаны выше в примере 1,

с использованием живых шванновских клеток.

2.3 Экспрессия рецепторов комплемента

sNF02.2 шванновские клетки культивируют и фиксируют на покровных стеклах перед окрашиванием на маркеры экспрессии. Полученные результаты приведены в таблице 10 ниже, и показывают, что все регуляторные белки комплемента экспрессируются на шванновских клетках. CD59 экспрессируется на высоком уровне, позволяя предположить, что мотонейроны защищены от MAC-опосредованного лизиса, так как CD59 является ключевым регулятором терминального пути. CD46, CD55 и C3aR показывают умеренную экспрессию на шванновских клетках, в то время как C5aR высоко экспрессируется на теле клетки шванновских клеток. Все CD35, CD11b и CD11c отсутствуют в шванновских клетках.

Таблица 10 Экспрессия регуляторных белков комплемента на фиксированных шванновских клетках

Маркер	**Наименование**	**Шванновские клетки (фиксированные)**
CD46	MCP	++
CD55	DAF	++
CD59	Протектин	+++
CD35	CR1	-
CD88	C5aR	++
C3aR		+
GM1		++
CD11b	CR3	-
CD11c	CR4	-

2.4 Связывание аутоантител, полученных от пациента с MMN, с фиксированными шванновскими клетками

Изучают связывание аутоантител, полученных от пациента с MMN, с фиксированными шванновскими клетками, и получают результаты, аналогичные результатам, приведенным в Примере 1.8 выше.

Шванновские клетки sNF02.2 культивируют на покровных стеклах (50000 клеток/покровное стекло) в 1 мл культуральной среды sNF02.2 в течение 3 дней с последующей фиксацией 4% PFA. Затем покровные стекла промывают PBS и гасят NH_4Cl_4 (5 мин, КТ), затем 2 часа блокируют с PBS-2% BSA. Окрашивание холерным токсином B - Alexa488 проводят для обнаружения экспрессии GM1. Результаты показывают, что культивированные in vitro шванновские клетки sNF0.2.2 человека экспрессируют GM1, так же как и клетки N2a мыши, полученные из нейробластомы.

Инкубация с сывороткой пациента с MMN приводит к значительному анти-GM1 окрашиванию, колокализованному с IgM окрашиванием. Различные сыворотки пациентов с MMN исследуют с широким диапазоном титров анти-GM1 IgM антитела, и все они демонстрируют связывание IgM с шванновскими клетками. Более того, связывание IgM антител с шванновскими клетками человека является GM-1-специфичным, поскольку инкубация с избыточными количествами растворимого не меченого холерного токсина

препятствует связыванию IgM антител из сывороток MMN. Предварительная инкубация со 100 мкг/мл не меченого холерного токсина эффективно предотвращает связывание анти-GM1 антител со шванновскими клетками из-за конкуренции за связывание между холерным токсином и анти-GM1 антителами и GM1 ганглиозидами.

Оценивают активирующий комплемент потенциал анти-GM1 антител IgM пациента на шванновских клетках. С этой целью шванновские клетки человека инкубируют с инактивированной нагреванием сывороткой от пациентов с MMN (содержащей аутореактивные анти-GM1 антитела IgM) и HPS (объединенной сывороткой человека), которая функционирует как внешний источник комплемента. Отложение факторов комплемента, таких как образование C4 и C3, определяют с использованием специфических антител. Результаты показывают, что C4 фиксация может быть обнаружена на шванновских клетках, что коррелирует с анти-GM1 титрами. Однако высокий титр анти-GM1 IgM не всегда связан с высоким отложением C4.

Оценивают обнаружение C3, и покровные стекла окрашивают различными анти-C3 антителами. Затем, шванновские клетки, опсонизированные с различной сывороткой пациентов с MMN, показывают C3 фиксацию на этих клетках. Однако, высокие титры анти-IgM GM1 не всегда коррелируют с высоким отложением C3. Все контроли с EDTA являются отрицательными.

В таблице 11 ниже суммированы различные уровни экспрессии фактора комплемента в различных образцах пациентов с MMN.

Таблица 11: Фиксация C3 и C4 различных образцов пациентов с MMN

Пациент	Титр анти-IgM GM1*	Фиксация C3	Фиксация C4
MMN-005	1: 800	Высокая	Высокая
MMN-014	1: 0	Низкая	Низкая
MMN-017	1: 800	Низкая	Низкая
MMN-024	1: 6400	Средняя	Высокая
MMN-035	1: 100	Низкая/средняя	Низкая
MMN-042	1: 1600	Средняя	Высокая
MMN-052	1: 25600	Низкая	Низкая/средняя
MMN-073	1: 25600	Средняя	Высокая

* Определено на основе GM1 ELISA.

В заключение, фиксация C4 и C3 обнаружена на фиксированных шванновских клетках после опсонизации с сывороткой пациента MMN. Это указывает на то, что анти-GM1 антитела IgM от пациентов с MMN могут активировать классический путь активации комплемента.

2.5 C2 зависимость

C2 зависимость оценивают, чтобы проверить важность фактора комплемента C2 в патогенезе MMN. Поэтому, шванновские клетки опсонизируют с C2-обедненной

сывороткой и восстанавливают с увеличивающимися концентрациями очищенного C2 человека (hC2), чтобы оценить образование C3. Результаты не выявили фиксацию C3 с C2-обедненной сывороткой. Тем не менее, добавление C2 восстанавливает фиксацию C3 в зависимости от концентрации. Интересно, что для блокировки фиксации C3 не требуется полная блокировка C2; 4,58 мкг/мл hC2 (примерно 20% от физиологических уровней) едва показывает формирование C3.

Чтобы подвести итог, фиксация C3 зависит от присутствия C2. Полное ингибирование C2 не требуется для блокирования классического пути активации комплемента и, тем самым, предотвращения образования C3 на шванновских клетках.

2.6 Эффективность ARGX-117 на фиксированных шванновских клетках

Перед фиксацией шванновские клетки культивируют в течение 3 дней на покровных стеклах. Затем клетки промывают, гасят и блокируют с последующей опсонизацией сыворотки пациента. После этого клетки инкубируют с комплемент-активной сывороткой в присутствии или в отсутствие различных антител, блокирующих комплемент, или IVIg в течение 20 минут при КТ. Наконец, клетки окрашивают и визуализируют с использованием 40x увеличения.

Фиксация C4 на шванновских клетках ингибируется TNT009 (200 мкг/мл), а также обработкой 12,5 мг/мл IVIg.

Ингибирование C3 наблюдают с ARGX-117 и TNT009, оба в количестве 200 мкг/мл, тогда как эффект не был замечен с экулизумабом или OMS646, как ожидалось. IVIg в концентрации 12,5 мг/мл показал только частичное ингибирование фиксации C3 на шванновских клетках. Таким образом, высокие концентрации (200 мкг/мл) ингибиторных антител комплемента способны блокировать фиксацию C4 и C3 в этой in vitro модели заболевания MMN.

Для того, чтобы определить различные эффекты антител против комплемента, проводят титрование и анализируют нижестоящие события комплемента. Фиксированные шванновские клетки опсонизированным с сывороткой пациента с MMN, комплемент активируют в присутствии возрастающих концентраций антител, блокирующих комплемент (TNT009, экулизумаб и ARGX-117), начиная с 15 мкг/мл до 480 мкг/мл. Полученные результаты не показывают ингибирующее действие на фиксацию C3 с экулизумабом, поскольку он ингибирует ниже от C3. ARGX-117 показывает полное ингибирование фиксации C3 до концентрации приблизительно 30 мкг/мл.

C. Заключение

Ингибирующее действие на комплемент ARGX-117, таргетирующего C2B человека, оценивают в in vitro модели с использованием фиксированных шванновских клеток, тем самым имитируя патофизиологию MMN. Данные показывают, что шванновские клетки экспрессируют высокие уровни регуляторных белков комплемента CD46, CD55 и CD59. Кроме того, было показано, что анти-GM1 IgM антитела от пациентов с MMN активируют классический путь активации комплемента, и что фиксация C3 зависит от наличия C2 в модели MMN. ARGX-117 эффективно блокирует

активацию комплемента и превосходит и экулизумаб, и TNT009.

Пример 3 Ингибирование комплемента в in vitro модели мультифокальной моторной нейропатии (MMN) с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC)

А. Методы

3.1 Протокол дифференциации мотонейронов спинного мозга из iPSC

Клетки, подобные мотонейронам (MN) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) получают, как описано в литературе (Harschnitz O et al. J Clin Immunol. 2014, Jul;34 Suppl 1:S112-9) и в кооперации с Dr L van der Pol и его сотрудниками, Department of Neurology, UMCU, The Netherlands. Коротко, фибробласты человека получают из биопсии кожи здоровых индивидуумов согласно протоколу, утвержденному институциональным наблюдательным советом. Эти клетки культивируют при 37°C с 5% CO_2 в среде эмбриональных фибробластов мыши (MEF), содержащей DMEM GlutaMAX с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки перепрограммируют в течение первых 5 пассажей согласно следующему протоколу. Фибробласты человека высевают при плотности 10000 клеток на лунку 6-луночной чашки и культивируют в течение 24 часов в среде MEF. Впоследствии, вирусную трансдукцию проводят со смесью, содержащей среду MEF, 4 мг/мл бромида гексадиметрина, и лентивирусным вектором, экспрессирующим Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. После 24-часовой инкубации клетки промывают 3 раза PBS, pH 7,4, и культивируют в течение 5 дополнительных дней в MEF среде. После этого клетки инкубируют с трипсином-EDTA и переносят в 10 см чашку, предварительно покрытую 0,1% желатина и содержащую конфлюентный слой облученного MEF в MEF среде. Культуральную среду меняют на среду эмбриональных стволовых клеток человека (huES), содержащую DMEM-F12, нокаут замены сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицин, L-глутамин, не жизненно важные аминокислоты, β-меркаптоэтанол и 20 нг/мл основного рекомбинантного фактора роста фибробластов человека. Колонии iPSC отбирают вручную через 3-6 недель для дальнейшего размножения и характеризации. iPSC поддерживают в среде huES, криоконсервируют после 4-6 пассажей, и хранят в жидком азоте. iPSC культивируют на облученных MEF в среде huES и пассируют вручную. Культивирование iPSC без питательного раствора проводят на Geltrex и поддерживают в mTeSR1 среде. Культивированные iPSC без питательного раствора пассируют ферментативно с использованием Accutase.

3.2 Протокол оценки ARGX-117 in vitro

iPSC культивируют в течение 12-14 дней на покровных стеклах при 37°C, 5% CO_2, в направлении MN. Затем, iPSC-MN фиксируют с использованием 4% PFA (10 мин при 4°C), промывают 3 раза 500 мкл PBS и покровные стекла удаляют из 24-луночных планшетов. Для минимизации неспецифического окрашивания и нейтрализации закрепителя, клетки гасят с помощью 100 мкл 50 мМ NH_4Cl в течение 5 мин при КТ, промывают один раз в PBS (все стадии промывки через погружение покровного стекла) с

последующим блокированием с 100 мкл PBS+2% BSA в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания PBS клетки инкубируют по нисходящей с инактивированными нагреванием сыворотками пациентов с MMN, разведенными 1:50 в PBS+2% BSA, в течение 60 мин. Затем клетки промывают один раз в PBS, инкубируют по нарастающей с 15% комплемент-активной сывороткой (-/+ предварительная инкубация с антителами, блокирующими комплемент) в течение 30 мин при КТ и промывают один раз в PBS. Затем клетки окрашивают 100 мкл первичных антител (разведенных в PBS+2% BSA) и инкубируют по нисходящей (1 ч, КТ, темнота) до промывания в PBS. Затем клетки инкубируют по нисходящей с 100 мкл стрептавидина-APC (1:100 разведенный в PBS+2% BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте с последующим промыванием один раз PBS и один раз MilliQ водой (также погружая покровное стекло). После сушки покровных стекол на ткани, 7 мкл ProLong™ Diamond Antifade Mountant с DAPI пипетируют на предметное стекло, и покровные стекла размещают по нисходящей на капле и сушат в течение ночи при комнатной температуре, затем фиксируют лаком для ногтей. Клетки анализируют с помощью микроскопа Zeiss Z1 со светодиодами Colibri со следующими параметрами: 40x или 20x увеличение (в зависимости от эксперимента), 25% LED, 400 мс для Alexa Fluor™ 488 канала, 100 мс для APC канала и 50 мс для DAPI канала (если не указано иное). Делают четыре фотографии на состояние по всему покровному стеклу. Все фотографии нормализуют на положительный и отрицательный контроль и экспортируют в одном и объединенном канале в не сжато 8-бит TIFF-формате с использованием программного обеспечения ZEN 2012. Средний уровень яркости рассчитывают для каждого отдельного канала с помощью ImageJ (Фиджи). Соотношения рассчитывают в Microsoft Excel 2010 и визуализируют с использованием GraphPad Prism 7. Антитела, используемые для окрашивания, показаны в таблице 12 ниже.

Таблица 12 Окрашивающие антитела

Антитело	**Метка/ Флуорохром**	**Компания**	**Кат. №**	**Коэффициент увеличения**
Поликлональное анти-человеческое C4 козы	Биотин	MyBioSource	MBS560216	1:100
Поликлональное анти-человеческое C3[(1)] овцы	Биотин	MyBioSource	MBS560642	1:100
Анти-C5b-9 [(2)]	Биотин	Novus Bio	NBP2-23494	1:500
Стрептавидин	APC	ThermoFisher eBioscience™	17-4317-82	1:100
Подъединица B холерного токсина	Alexa Fluor™ 488	ThermoFisher	C34775	1:500
Анти-человеческий C3 клон 9	Биотин	Sanquin	MW1830	1:100
Анти-человеческий C3 клон 28	Биотин	Sanquin	MW1860	1:100
μ-цепь анти-человеческого IgM	Биотин	Sigma Aldrich	B1265	1:300

козы				
CD46	APC	ThermoFisher	A15711	1:50
CD55	APC	BioLegend	311312	1:50
CD59	APC	Life technologies	17-0596-42	1:50
Анти-мышиное IgG козы	AF647	Invitrogen	A21235	1:400
GM1	AF488	Invitrogen	C34775	1:500
CD35	APC	BD	565329	1:50
CD11b	APC	Invitrogen	17-0118-42	1:50
CD11c	APC	BD	333144	1:50
C3aR	APC	Biolegend	345805	1:50
C5aR	FITC	GeneTex	GTX75734	1:50
Поликлональное анти-человеческое IgM кролика		Dako	A0425	1:1000
Поли анти-кроличье Ig свиньи	HRP	Dako	P0217	1:10000

(1) Взаимодействует и с C3a, и с C3b человека.

(2) Анти-C5b-9 клон aE11 направлен против неоэпитопа, экспонированного на C9, при включении в TCC.

3.3 Протокол для определения GM1 с использованием ELISA

Планшеты NUNC maxisorp покрывают GM1 (5 мкг/мл) в метаноле. Метанол выпаривают в течение +/- 2,5 ч в шкафу с ламинарным потоком. Затем лунки блокируют 200 мкл 1% BSA-PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Сыворотки пациента с MMN разводят в 1% BSA-PBS (либо предварительно инкубируют с IVIg) и 100 мкл добавляют в каждую лунку с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C. Затем планшеты промывают 6 раз PBS, и затем инкубируют с первичным антителом, определяющим IgM человека в 1% BSA-PBS (1 ч при КТ). После шести стадий промывки с PBS, лунки инкубируют с 100 мкл HRP-конъюгированного вторичного антитела в течение 1 ч при КТ. После шести стадий промывки с PBS добавляют TMB и реакцию останавливают с помощью хлористоводородной кислоты. Планшеты анализируют при 415 нм с помощью ридера BioRad ELISA.

B. Результаты

Для исследования патогенности анти-GM1 IgM антител у пациентов с MMN, разработана in vitro модель для MMN, поскольку в настоящее время никакая животная модель MMN не доступна. Коротко, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были создают из фибробластов и дифференцируют в мотонейроны, как описано выше. Затем эти мотонейроны фиксируют на покровных стеклах с использованием параформальдегида (PFA) и гасят NH_4Cl. Затем клетки опсонизируют с использованием сыворотки пациента с MMN, содержащей анти-GM1 IgM аутоантитела, в течение 1 часа, позволяя связывание этих аутоантител с GM1. После промывания комплемент активируют с помощью объединенной сыворотки человека (HPS) в присутствии или в отсутствии антител, блокирующих комплемент, в течение 30 минут. Наконец, клетки

окрашивают с антителами против факторов комплемента для оценки активности комплемента. Результаты этих исследований описаны ниже.

3.4 Экспрессия рецепторов комплемента на мотонейронах, полученных из iPSC

Чтобы лучше понять роль комплемента в патофизиологии MMN, экспрессию регуляторных белков комплемента и рецепторов комплемента оценивают на iPSC-MN. Поэтому iPSC-MN культивируют и фиксируют с использованием 4% PFA на покровных стеклах перед окрашиванием на маркеры экспрессии. Результаты показаны в **таблице 13** и на **фигуре 13**.

Таблица 13 Экспрессия регуляторных белков комплемента на iPSC-MN

Маркер	**Наименование**	**Мотонейроны, полученные из iPSC**
CD46	MCP	++
CD55	DAF	++
CD59	Протектин	+++
CD35	CR1	+
CD88	C5aR	++
C3aR		++
GM1		+++
CD11b		-
CD11c		-

Эти результаты показывают, что все регуляторные белки комплемента (CD46, CD55 и CD59) экспрессируются на фиксированных мотонейронах. CD59 высоко экспрессируется, что позволяет предположить, что мотонейроны защищены от лизиса, опосредованного MAC. CD46 и CD55 показывают промежуточную экспрессию, локализованную в теле клетки. И C3R, и C5R экспрессируются на мотонейронах, причем C5aR экспрессируется только на теле клетки, а не на нейритах. CD11b и CD11c отсутствуют, тогда как экспрессия CD35 является низкой.

3.5 Связывание аутоантител, полученных от пациента с MMN, с iPSC-MN

Связывание анти-GM1 IgM антител с iPSC-MN исследуют in vitro. С этой целью iPSC-MN культивируют на покровных стеклах (80000-150000 клеток/13 мм покровное стекло) в 1200 мкл культуральной среды hMN в течение 12-14 дней с последующей фиксацией 4% PFA. Затем покровные стекла промывают PBS и гасят NH_4Cl_4 (5 мин, КТ), затем 2 часа блокируют PBS-2% BSA. Окрашивание холерным токсином B-Alexa 488 проводят для обнаружения экспрессии GM1. Результаты показывают, что мотонейроны, полученные из iPSC, экспрессируют GM1, и инкубация с сывороткой пациентов с MMN приводит к значительному окрашиванию анти-GM1, колокализованному с окрашиванием IgM.

Также оценивают потенциал активации комплемента анти-GM1 IgM антител пациента на мотонейронах, полученных из iPSC. С этой целью, мотонейроны человека,

полученные из iPSC, инкубируют с инактивированной нагреванием сывороткой от пациентов с MMN (содержащей аутореактивные анти-GM1 IgM антитела) и HPS, который функционирует в качестве внешнего источника комплемента. Отложение факторов комплемента, таких как C4 и C3, определяют с использованием специфических антител. Результаты показывают, что фиксация C4 и C3 может быть обнаружена на iPSC-MN. Однако высокие титры анти-IgM GM1 не всегда коррелируют с высоким отложением C3. В заключение, фиксация C4 и C3 обнаружена на фиксированных iPSC-MN после опсонизации с сывороткой пациента с MMN. Это указывает на то, что антитела IgM к GM1 от пациентов с MMN могут активировать классический путь активации комплемента.

3.6 C2-зависимость

C2 зависимость оценивают для подтверждения важности фактора комплемента C2 в патогенезе MMN. Мотонейроны, полученные из iPSC, опсонизируют с C2-обедненной сывороткой и восстанавливают с увеличивающейся концентрацией очищенного C2 человека (hC2) для оценки активации комплемента путем измерения фиксации C3. Результаты показаны на **фиг. 14** и не выявляют фиксации C3 с C2-обедненной сывороткой. Однако, добавление C2 восстанавливает фиксацию C3 в зависимости от концентрации. Более того, ARGX-117 полностью ингибирует фиксацию C3 в C2-обедненной сыворотке, восстанавливает физиологическими количествами hC2.

Подводя итог, фиксация C3 зависит от присутствия C2. Об этом свидетельствует способность ARGX-117 ингибировать фиксацию C3в присутствии hC2. Оказывается , что полное ингибирование C2 не требуется для того, чтобы блокировать классический путь активации комплемента и предотвратить образование C3.

3.7 Эффективность ARGX-117 по предотвращению фиксации комплемента на фиксированных iPSC-MN

Как описано в разделе 1.9 выше, различные ингибирующие моноклональные антитела против факторов комплемента получают, и некоторые из них одобряют для клинического применения. Эффект этих ингибиторных антител изучают на фиксированных iPSC-MN. С этой целью, iPSC-MN культивируют в течение 12-14 дней на покровных стеклах до фиксации. Затем клетки промывают, охлаждают и блокируют с последующей опсонизацией сывороткой пациента. После этого клетки инкубируют с комплемент-активной сывороткой в присутствии или в отсутствии различных антител, блокирующих комплемент, в течение 20 минут при КТ. Наконец, клетки окрашивают и визуализируют с помощью 40x или 20x увеличения.

Фиксация C4 на мотонейронах ингибируется TNT009 (200 мкг/мл), а не другими mAb, как ожидалось.

Ингибирование C3 наблюдают при использовании ARGX-117 и TNT009 в концентрации 200 мкг/мл, тогда как при использовании экулизумаба, OMS646 и ритуксимаба в той же концентрации эффекта не наблюдают. Таким образом, высокие концентрации (200 мкг/мл) ARGX-117, блокирующие C2, способны блокировать

последующую фиксацию C3 в этой in vitro модели заболевания для MMN.

Для определения дифференциальных эффектов антител против комплемента, проводят титрование и анализируют последующие события комплемента. Фиксированные мотонейроны, полученные из iPSC, опсонизируют сывороткой пациентов с MMN. Комплемент-активную сыворотку предварительно инкубируют с возрастающими концентрациями антител, блокирующих комплемент (TNT009, OMS646 и ARGX-117), начиная с 3 мкг/мл вплоть до 200 мкг/мл, затем добавляют к iPSC-MN. Результаты показывают отсутствие ингибирующего действия на фиксацию C3 с OMS646, поскольку он ингибирует лектиновый путь. ARGX-117 показывает полное ингибирование фиксации C3 до концентрации приблизительно 12 мкг/мл. Такие же результаты получают с TNT009, где отложение C3 также заблокировано до 12 мкг/мл. Таким образом, ARGX-117 и TNT009 одинаково хорошо подавляют фиксацию C3 на мотонейронах, полученных из iPSC, опсонизированных сывороткой пациентов с MMN.

3.8 Ингибирование комплемента ARGX-117 при других иммуноопосредованных нейропатиях

Аутоиммунные периферические нейропатии представляют собой клинически неоднородную группу редких и инвалидизирующих заболеваний, характеризующихся моторными и/или сенсорными симптомами степени тяжести заболевания. При MMN это является прямым доказательством аутоиммунной реактивности, опосредованной специфическими антителами IgM, нацеленными на GM1. Были идентифицированы другие иммуноопосредованные нейропатии, включая хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию (CIDP) как наиболее частое, и синдром Гийена-Барре (GBS) как наиболее острое заболевание. Для оценки терапевтических эффектов ARGX-117 на другие иммуноопосредованные нейропатии используют описанную выше in vitro модель. Однако вместо опсонизирующей мотонейроны, полученные из iPSC, сыворотки пациентов с MMN используют сыворотки от пациентов с GBS и CIDP, соответственно. Результаты показаны на **фиг. 15,** и показывают, что аутоантитела присутствующие в обоих сыворотках пациентов, могут активировать комплемент, измеренный как фиксация C3 на мотонейронах, и он заблокирован добавлением 200 мкг/мл ARGX-117. Таким образом, в дополнение к MMN, ARGX-117 также блокирует комплемент в модели болезни для других иммуноопосредованных нейропатий.

3.9 Влияние IVIg на ингибирование комплемента с использованием анализа MMN in vitro

IVIg являются биологическими агентами, часто используемыми для лечения различных аутоиммунных заболеваний. При MMN, IVIg одобрен FDA и является препаратом первой линии лечения. За иммунную модуляцию с IVIg отвечают несколько механизмов, включая прямую нейтрализацию патогенных иммуноглобулинов, блокаду FcR и регуляцию нескольких иммунных клеток. IVIg также действует на ингибирование активации комплемента, поскольку IgG, присутствующий в IVIg, может связываться с C3,

тем самым истощая C3 из сыворотки и предотвращая терминальный путь активации комплемента (Terenghi F et al., Neurology, 2004, 62: 666-668; Fitzpatrick A, Mann C et al., J Peripher Nerv Syst, 2011, 16(2): 84-91). При MMN показано, что IVIg снижает патологическое отложение комплексов анти-GM1-GM1 (Bhatheja K, Field J. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(12):1995). Стандартным лечением MMN является IVIg; однако это лечение неэффективно при длительном применении. Следовательно, ингибирующий эффект комплемента IVIg был исследован с использованием модели MMN in vitro с использованием мотонейронов, полученных из iPSC. С этой целью, мотонейроны, полученные из iPSC, культивируют на покровных стеклах, фиксируют и опсонизируют сывороткой пациентов с MMN перед добавлением комплемент-активной сыворотки для активации системы комплемента. Тестируют две марки IVIg (GammaQuin и Nanogam), и также были оценивают различные подходы лечения IVIg. Во-первых, 50 мг/мл IVIg добавляют на этапе опсонизации, когда IVIg не может блокировать фиксацию C3 на мотонейронах. Во-вторых, вводят IVIg во время опсонизации и активации комплемента или только во время активации комплемента, соответственно. Оба они приводят к снижению фиксации C3, и GammaQuin показывает самый сильный эффект на ингибирование комплемента по сравнению с Nanogam (см. **Рис. 16**).

Чтобы оценить анти-идиотипический эффект IVIg, проводит конкурентный ELISA для GM1 с использованием сывороток пациентов с MMN. Результаты, показанные на **фиг. 17,** показывают, что в этом анализе отсутствует конкурентный эффект IVIg для связывания GM1. Подводя итог, можно сказать, что лечение IVIg блокирует фиксацию C3 при добавлении на этапе активации комплемента, подтверждая, что IVIg истощает C3 из сыворотки. Однако, IVIg не влияет на идиотипические антитела.

C. Выводы

Ингибирующий комплемент эффект ARGX-117, таргетирующий C2b человека, оценивают в in vitro модели с использованием мотонейронов, полученных из iPSC, таким образом имитируя возможную патофизиологию MMN. Данные демонстрируют, что мотонейроны в этой системе экспрессируют регуляторные белки комплемента с максимальной экспрессией CD59. Более того, показано, что анти-GM1 IgM антитела от пациентов с MMN активируют классический путь активации комплемента, и что отложение C3 зависит от присутствия C2. ARGX-117 эффективно блокирует активацию комплемента не только у пациентов с MMN, но также блокируют активацию комплемента в образцах пациентов с CIDP и GBS. Кроме того, IVIg блокирует комплемент только на стадии активации комплемента и не влияет на антиидиотипические антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения парапротеинемической нейропатии у субъекта, включающий введение субъекту антагониста системы комплемента, отличающийся тем, что антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антагонист ингибирует классический путь активации комплемента и/или лектиновый путь активации комплемента.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что парапротеинемической нейропатией является демиелинизирующая нейропатия.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что парапротеинемическая нейропатия характеризуется присутствием иммуноглобулинов IgM, IgA или IgG.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что парапротеинемическая нейропатия характеризуется наличием аутоантител против нейронального антигена.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что нейрональным антигеном является ганглиозид или миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG).

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что ганглиозид выбран из GM1, GM1b, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GT3 и GQ1b.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что ганглиозидом является GM1.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что парапротеинемическая нейропатия выбрана из: мультифокальной моторной нейропатии (MMN), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Гийена-Барре (GBS), синдрома Миллера-Фишера, острой моторной аксональной нейропатии (AMAN), острой моторной и сенсорной аксональной нейропатии (AMSAN), синдрома хронической атаксической нейропатии-офтальмоплегии-IgM с антителами к парапротеину-холодовым агглютининам-дисиалозилу (CANOMAD), дистальной приобретенной демиелинизирующей симметричной (DADS) нейропатии, моноклональной гамма-ассоциированной периферической нейропатии, анти-MAG периферической нейропатии и синдрома POEMS.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что парапротеинемической нейропатией является MMN, CIDP или GBS.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что парапротеинемической нейропатией является MMN.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C3.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что антагонист ингибирует C1, C1q, C1r или C1s.

15. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что антагонист ингибирует фактор комплемента C2, C2a или C2b.

16. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что антагонист ингибирует

фактор комплемента C3, C3a или C3b.

17. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что антагонист ингибирует фактор комплемента C4, C4a или C4b.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что антагонист выбран из: видов ингибирующей РНК, например киРНК или кшРНК; низкомолекулярного ингибитора; биологического антагониста, например ингибирующего пептида или миметика антитела, такого как аффитело, аффилин, аффитин, аднектин, атример, эвазин, дарпин, антикалин, авимер, финомер, версателo или дуокалин; или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что антагонист выбран из: компстатина Cp40 (Amyndas); PEG-Cp40 (Amyndas); AMY-101 (Amyndas); AMY-201 (Amyndas); APL-1 и APL-2 (Apellis); Синриза (Shire); CDX-1135 (Celldex); APT070 Mirococept (MRC); HC3-1496 (InCode); нафамостата (Torii Pharmaceutical); и белка контроля комплемента вируса осповакцины (VCP).

20. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что антагонистом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что антителом является антитело IgG.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что антигенсвязывающий фрагмент выбран из: вариабельного домена легкой цепи (VL) антитела, вариабельного домена тяжелой цепи (VH) антитела, одноцепочечного антитела (scFv), $F(ab')_2$ фрагмента, Fab фрагмента, Fd фрагмента, Fv фрагмента, неполного (моновалентного) антитела, диатела, триатела, тетратела, унитела, доменные антитела и нанотела.

23. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C1, C1q, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a или C4b.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбран из: сутимлимаба BIV009/TNT009 (Bioverativ); ANX005 (Annexon); mAb H17 (Elusys Therapeutics); и TNT003 (True North).

25. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором комплемента C2.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом C2b фактора комплемента C2.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH и VL домены содержат последовательности CDR:

- HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2;
- HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3;
- HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4;
- LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5;
- LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6; и

- LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домен вариабельной тяжелой цепи (VH) и домен вариабельной легкой цепи (VL), где VH домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL домен содержит последовательности CDR:

- LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5;
- LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6; и
- LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7.

29. Способ по п. 27 или п. 28, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичность к ней, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичность к ней.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

31. Способ по любому из пп. 27-30, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

32. Способ по любому из пп. 25-27, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

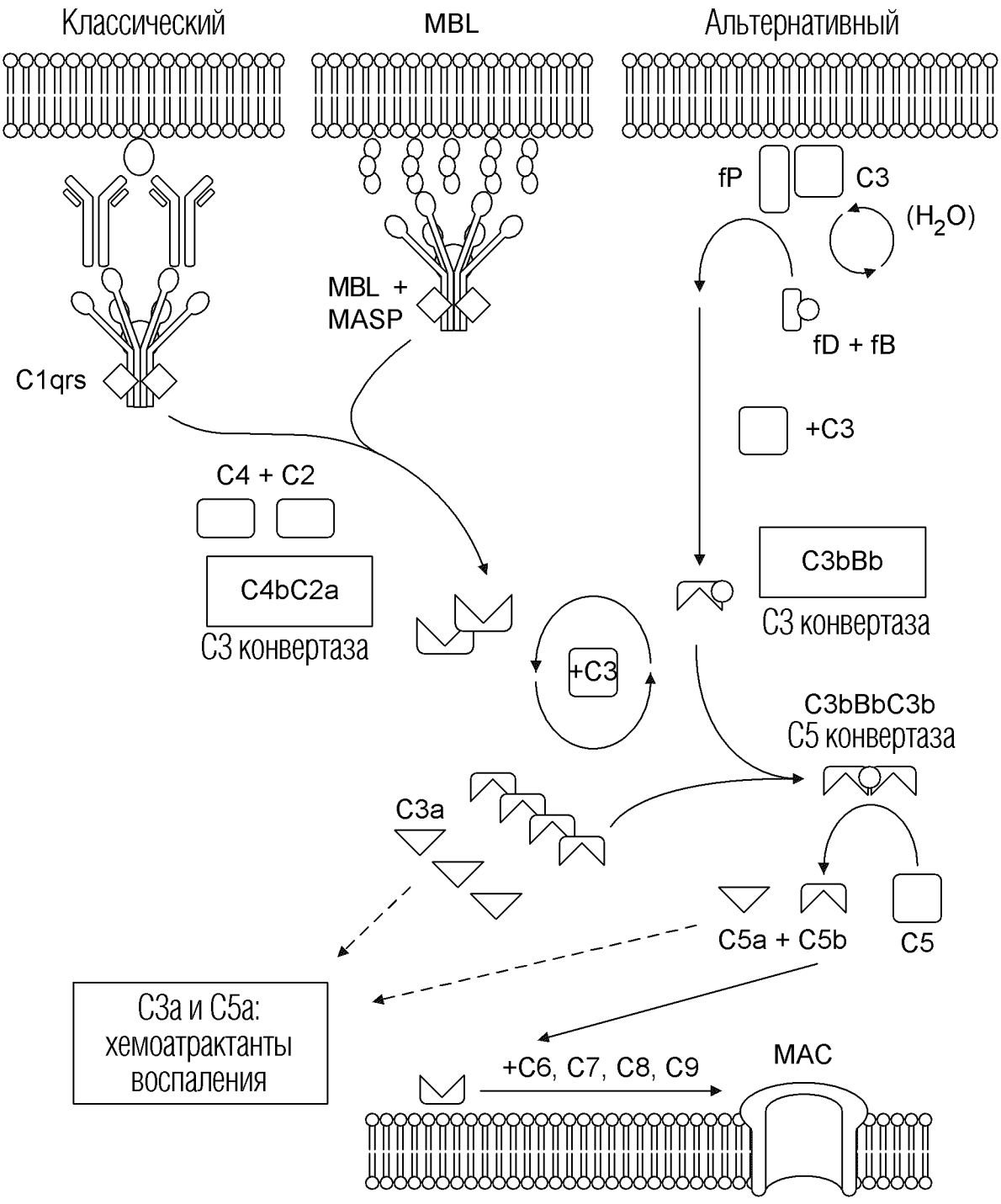
33. Способ по любому из пп. 1-32, дополнительно включающий введение субъекту IVIg.

34. Способ по любому из пп. 1-33, дополнительно включающий введение субъекту ритуксимаба.

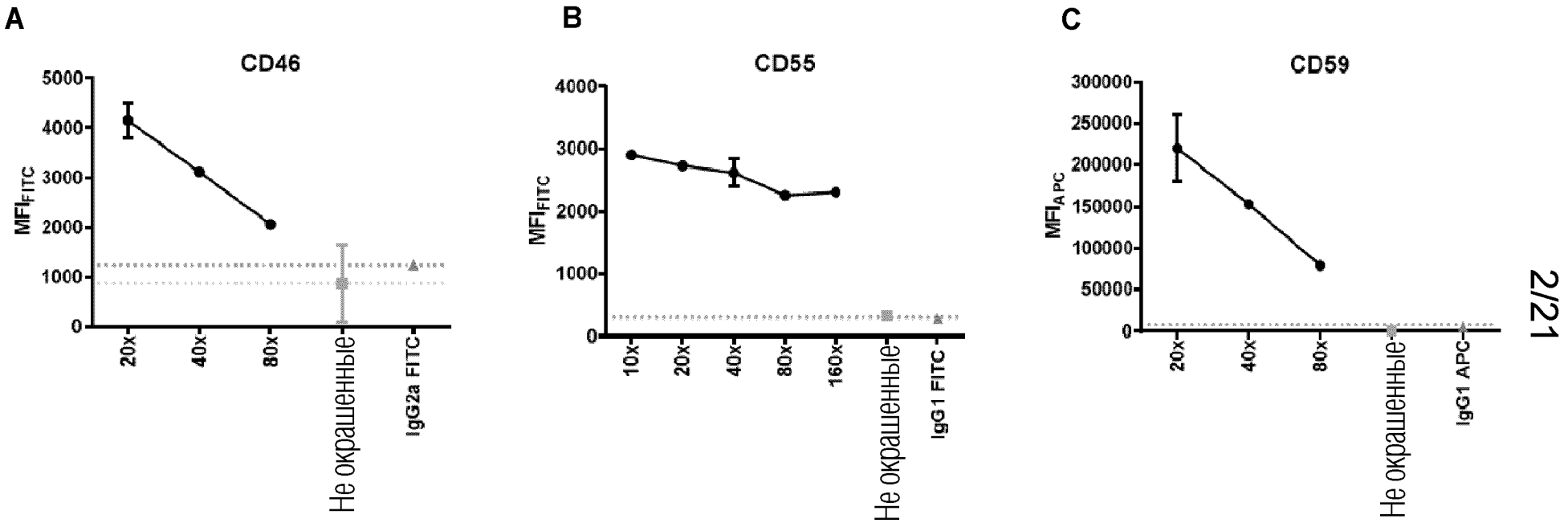
35. Антагонист системы комплемента для применения при лечении парапротеинемической нейропатии у субъекта, отличающийся тем, что антагонист ингибирует систему комплемента выше фактора комплемента C5.

По доверенности

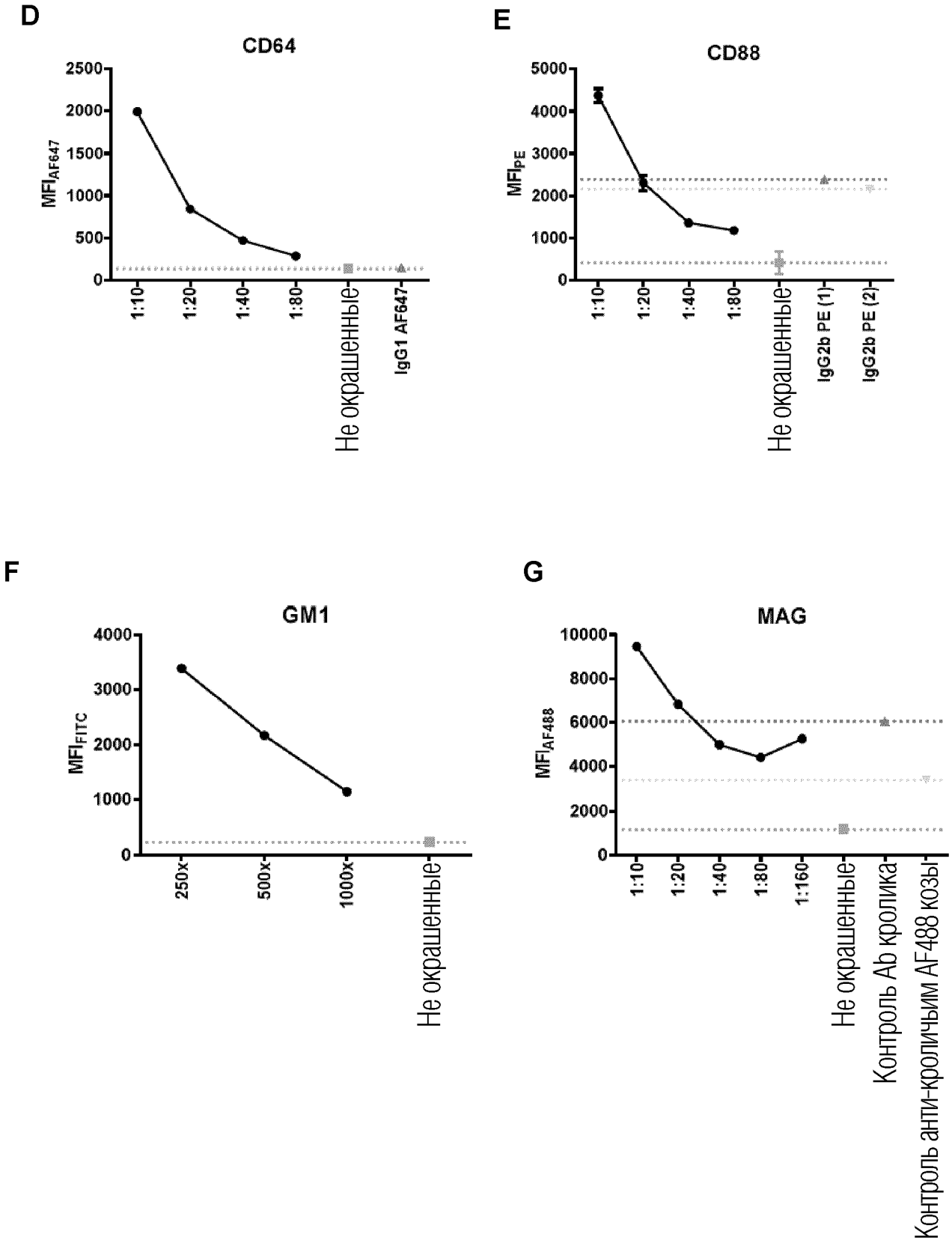
ФИГ. 1


Классический
MBL
Альтернативный
fP
C3
(H2O)
MBL +
MASP
fD + fB
C1qrs
+C3
C4 + C2
C3bBb
C4bC2a
C3 конвертаза
C3 конвертаза
+C3
C3bBbC3b
C5 конвертаза
C3a
C5a + C5b
C5
C3a и C5a:
хемоатрактанты
воспаления
+C6, C7, C8, C9
MAC

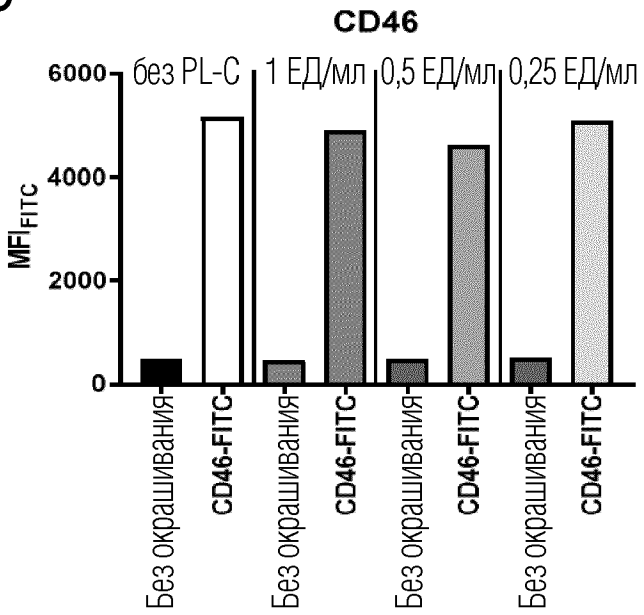
ФИГ. 2

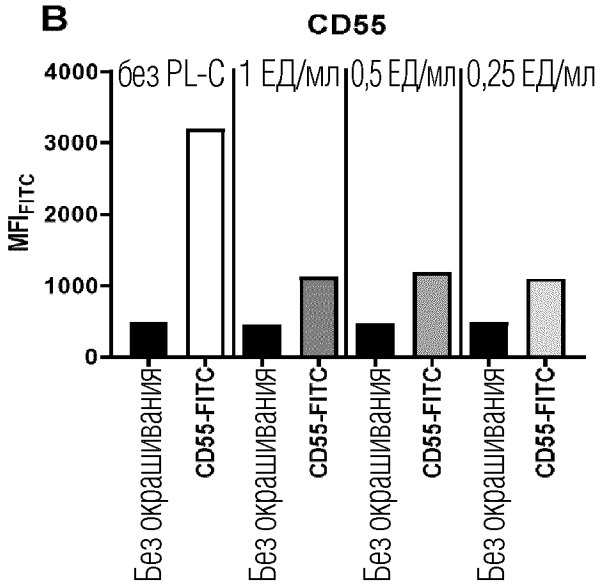

A
CD46
5000
4000
3000
2000
1000
0
MFI FITC
20x
40x
80x
Не окрашенные
IgG2a FITC
B
CD55
4000
3000
2000
1000
0
MFI FITC
10x
20x
40x
80x
160x
Не окрашенные
IgG 1 FITC
C
CD59
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
MFI A PC
20x
40x
80x
Не окрашенные
IgG1 APC

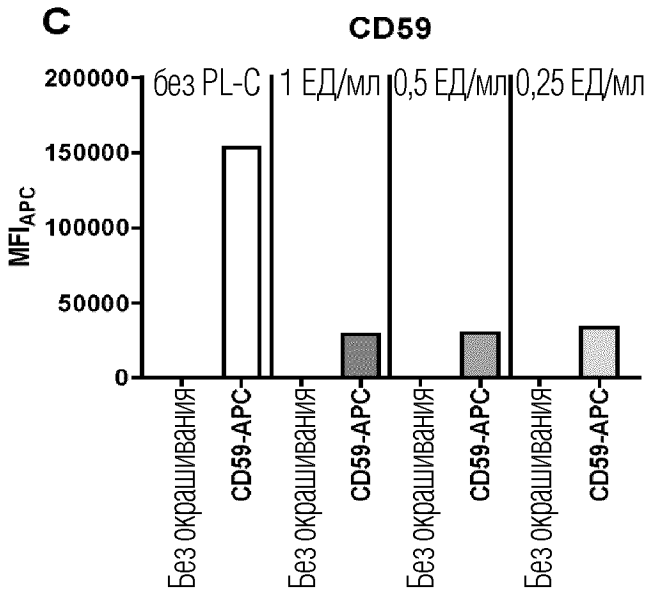
ФИГ. 2 (продолжение)



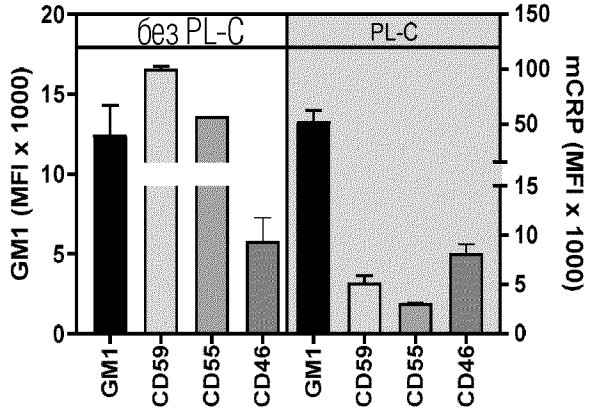
ФИГ. 3

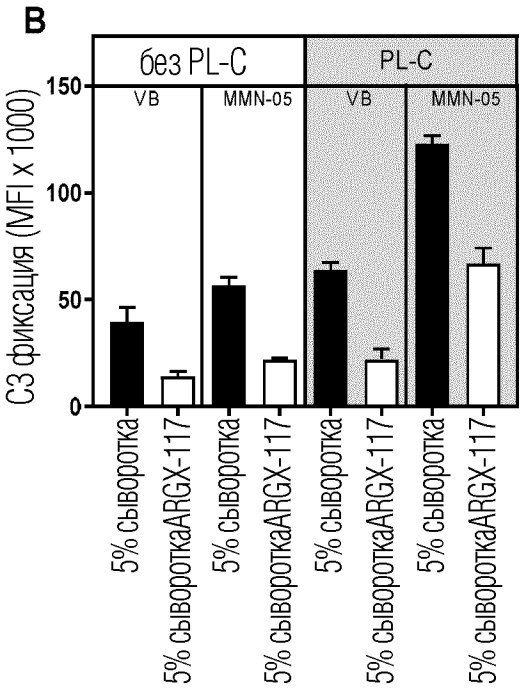

CD46
6000
4000
2000
0
MFI FITC
без PL-C
1 ЕД/мл
0,5 ЕД/мл
0,25 ЕД/мл
Без окрашивания
CD46-FITC
Без окрашивания
CD46-FITC
Без окрашивания
CD46-FITC
Без окрашивания
CD46-FITC

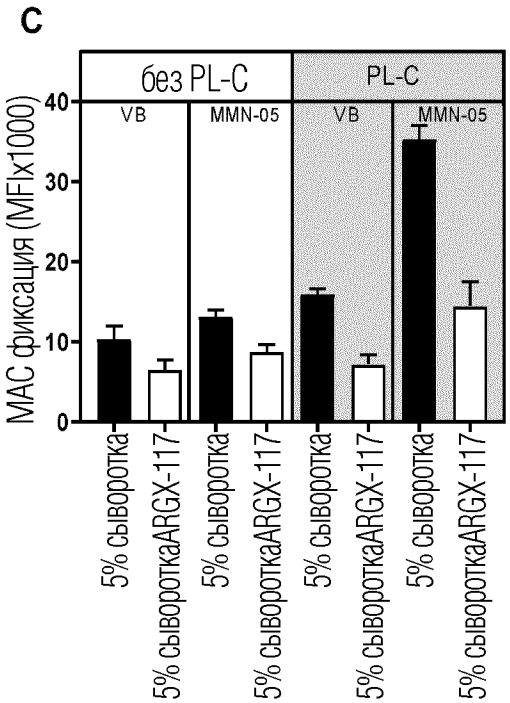

B
CD55
4000
3000
2000
1000
0
MFI FITC
без PL-C
1 ЕД/мл
0,5 ЕД/мл
0,25 ЕД/мл
Без окрашивания
CD55-FITC
Без окрашивания
CD55-FITC
Без окрашивания
CD55-FITC
Без окрашивания
CD55-FITC

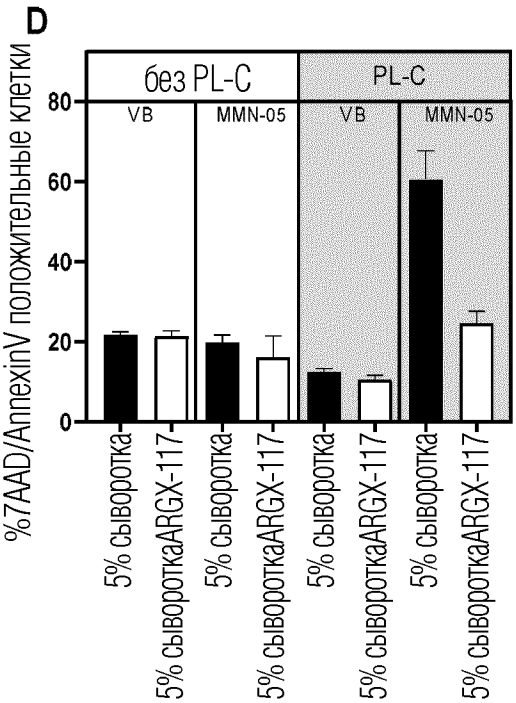

C
CD59
200000
150000
100000
50000
0
MFI APC
без PL-C
1 ЕД/мл
0,5 ЕД/мл
0,25 ЕД/мл
Без окрашивания
CD59-APC
Без окрашивания
CD59-APC
Без окрашивания
CD59-APC
Без окрашивания
CD59-APC

ФИГ. 4

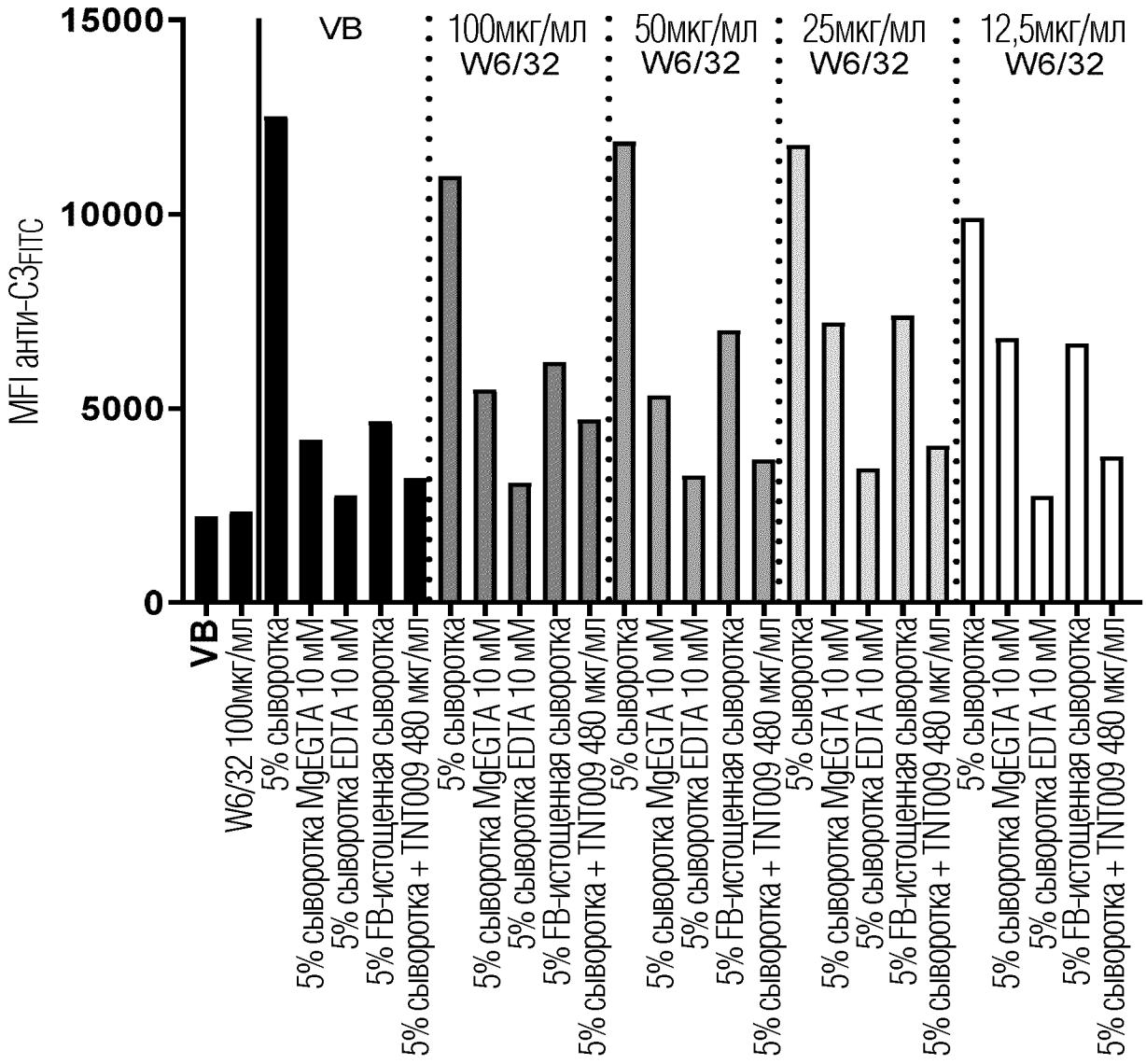

без PL-C
PL-C
GM1 (MFI x 1000)
mCRP (MFI x 1000)
GM1
CD59
CD55
CD46


B
без PL-C
PL-C
VB
MMN-05
C3 фиксация (MFI x 1000)
5% сыворотка
5% сывороткаARGX-117

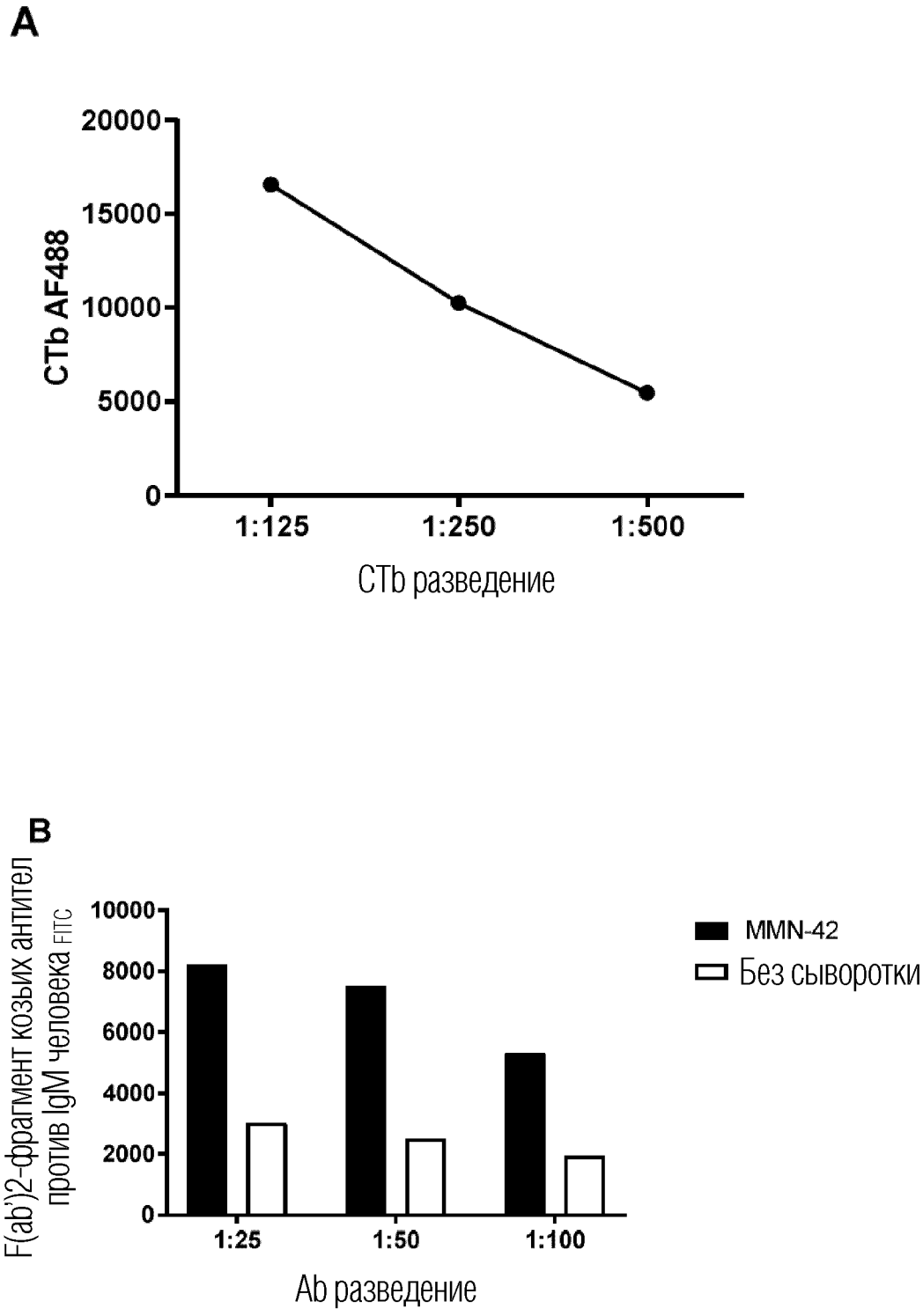

C
без PL-C
PL-C
VB
MMN-05
MAC фиксация (MFIx1000)
5% сыворотка
5% сывороткаARGX-117


D
без PL-C
PL-C
VB
MMN-05
%7AAD/AnnexinV положительные клетки
5% сыворотка
5% сывороткаARGX-117

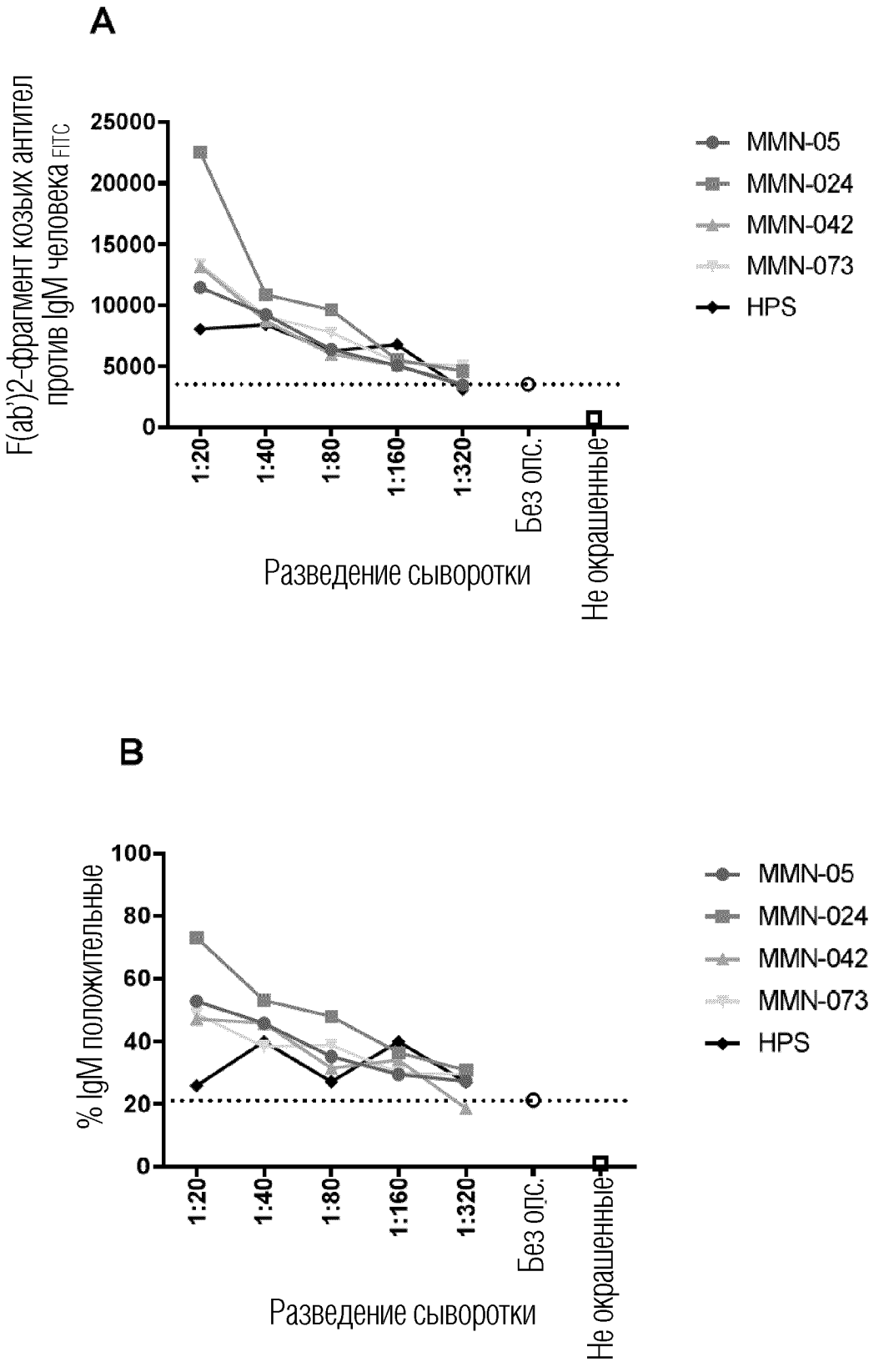
ФИГ. 5


15000
10000
5000
0
MFI анти-C3FITC
VB
100мкг/мл W6/32
50мкг/мл W6/32
25мкг/мл W6/32
12,5мкг/мл W6/32
VB
W6/32 100мкг/мл
5% сыворотка
5% сыворотка MgEGTA 10 мМ
5% сыворотка EDTA 10 мМ
5% FB-истощенная сыворотка
5% сыворотка + TNT009 480 мкг/мл

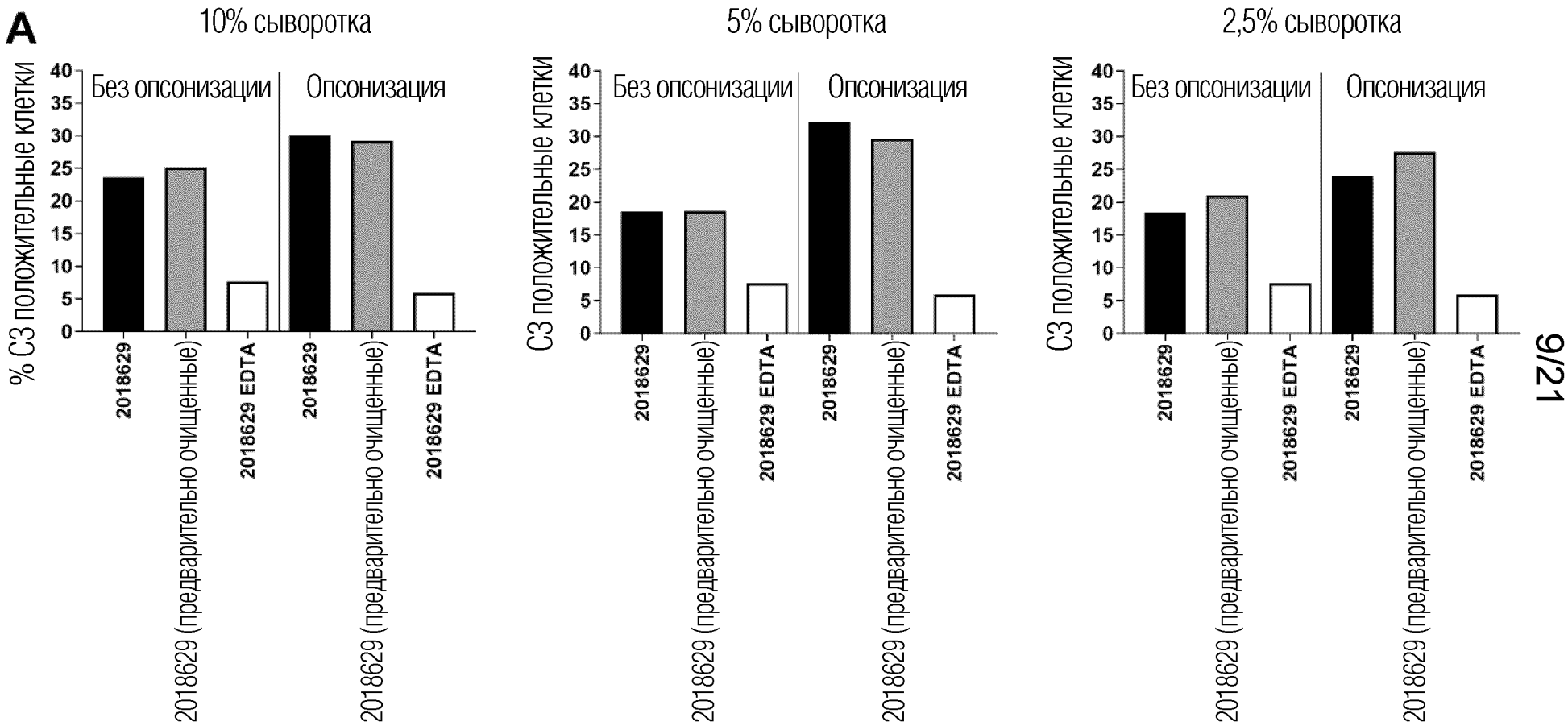
ФИГ. 6


A
20000
15000
10000
5000
0
CTb AF488
1:125
1:250
1:500
CTb разведение
B
10000
8000
6000
4000
2000
0
F(ab')2-фрагмент козьих антител против IgM человека FITC
1:25
1:50
1:100
Ab разведение
MMN-42
Без сыворотки

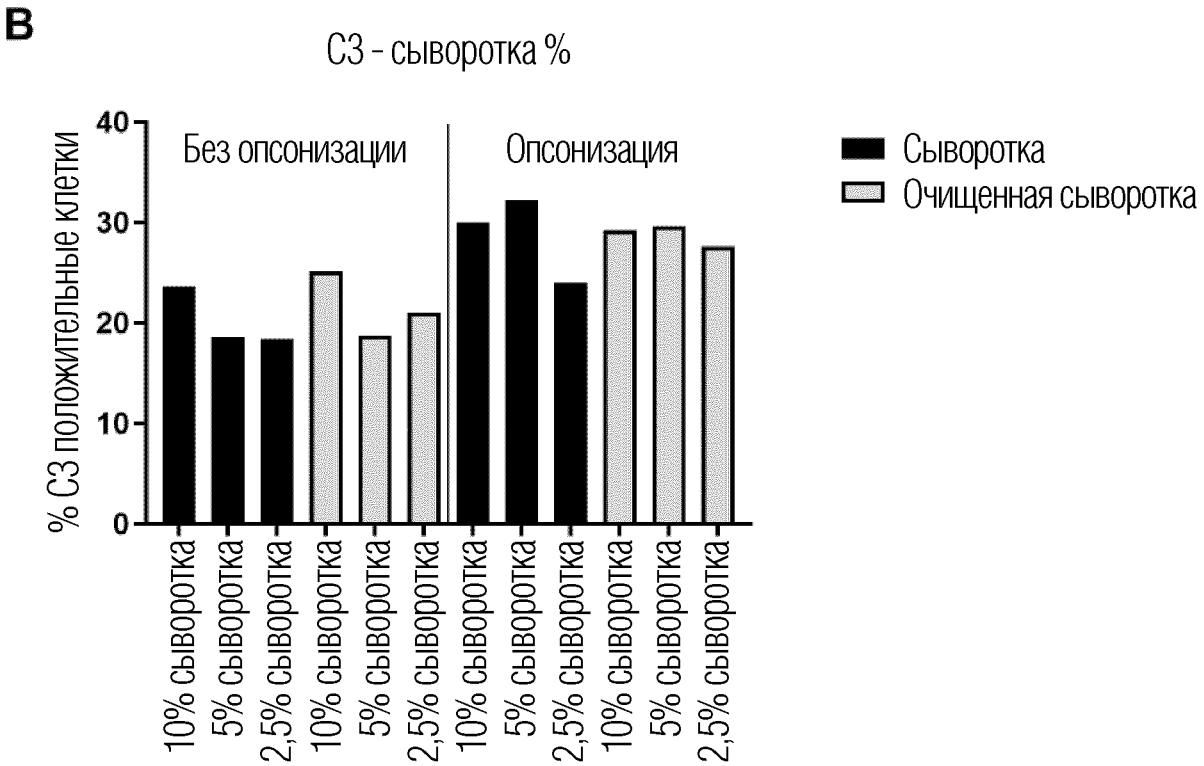
ФИГ. 7


A
F(ab')2-фрагмент козьих антител против IgM человека FITC
25000
20000
15000
10000
5000
0
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
Без опс.
Не окрашенные
Разведение сыворотки
MMN-05
MMN-024
MMN-042
MMN-073
HPS
B
% IgM положительные
100
80
60
40
20
0
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
Без опс.
Не окрашенные
Разведение сыворотки
MMN-05
MMN-024
MMN-042
MMN-073
HPS

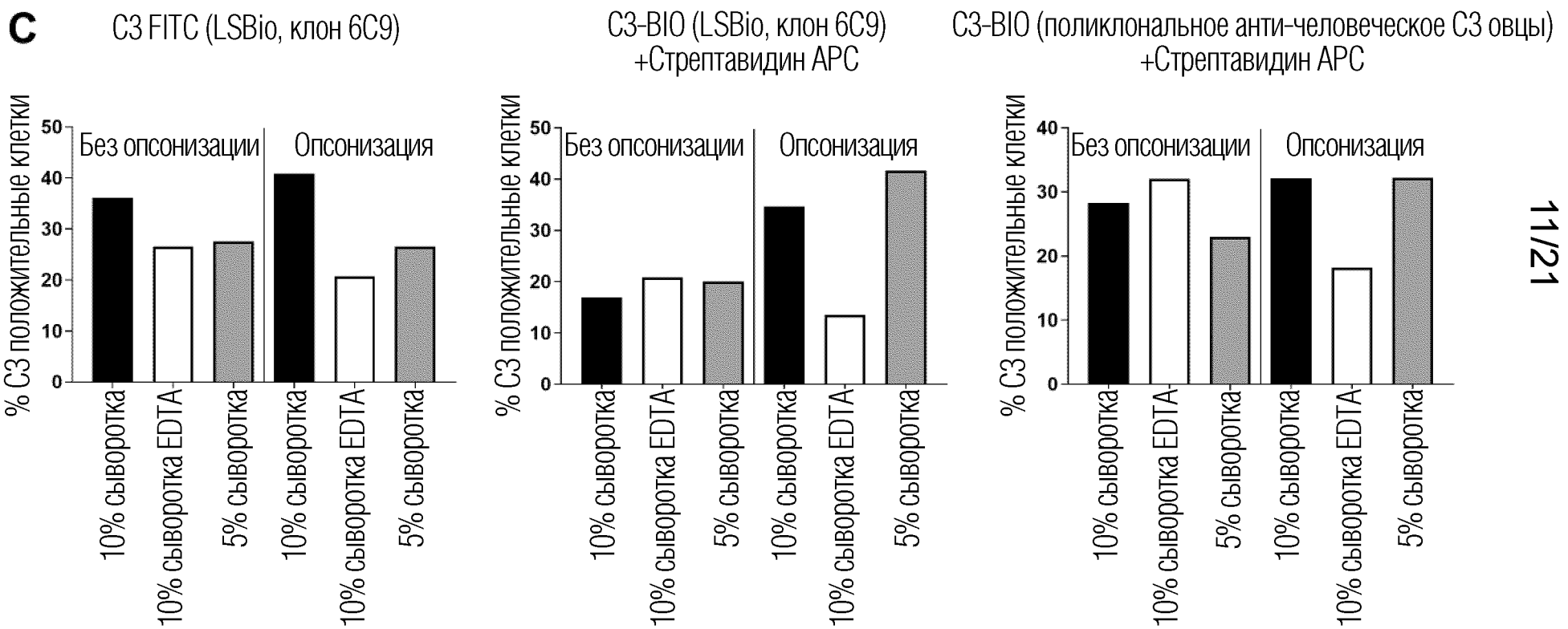
ФИГ. 8


A
10% сыворотка
5% сыворотка
2,5% сыворотка
% C3 положительные клетки
C3 положительные клетки
Без опсонизации
Опсонизация
0
5
10
15
20
25
30
35
40
2018629
2018629 (предварительно очищенные)
2018629 EDTA

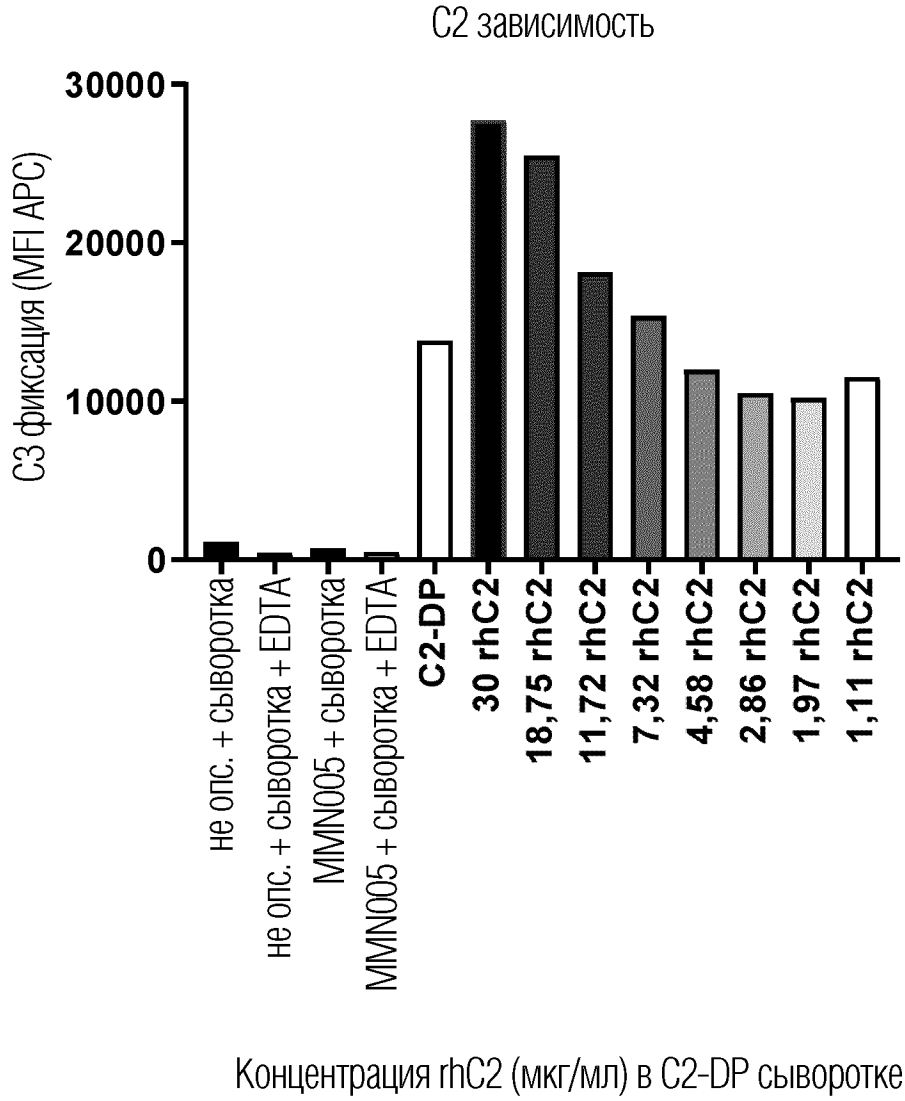
ФИГ. 8 (продолжение)



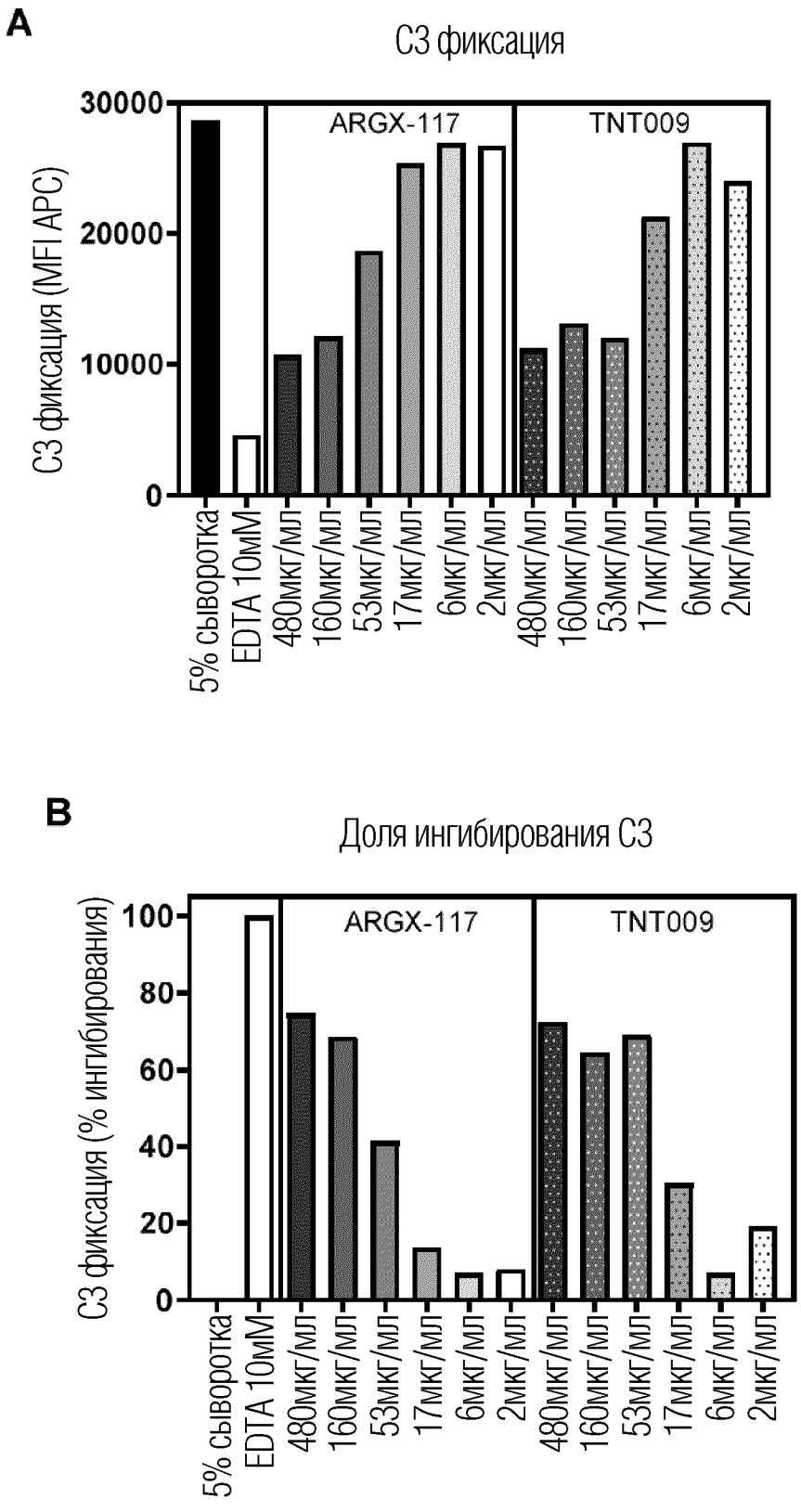
ФИГ. 8 (продолжение)



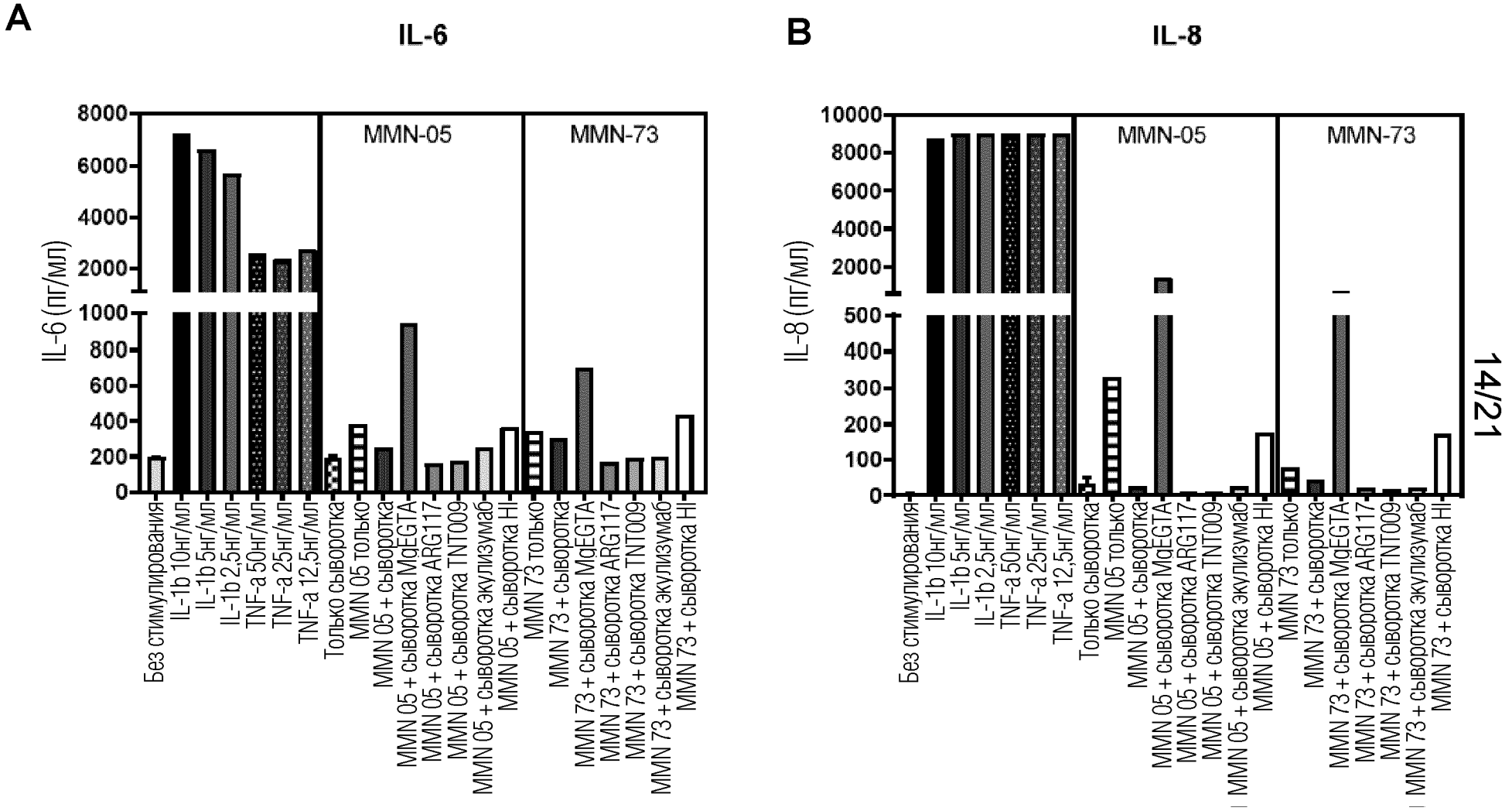
ФИГ. 9


C2 зависимость
C3 фиксация (MFI APC)
30000
20000
10000
0
не опс. + сыворотка
не опс. + сыворотка + EDTA
MMN005 + сыворотка
MMN005 + сыворотка + EDTA
C2-DP
30 rhC2
18,75 rhC2
11,72 rhC2
7,32 rhC2
4,58 rhC2
2,86 rhC2
1,97 rhC2
1,11 rhC2
Концентрация rhC2 (мкг/мл) в C2-DP сыворотке

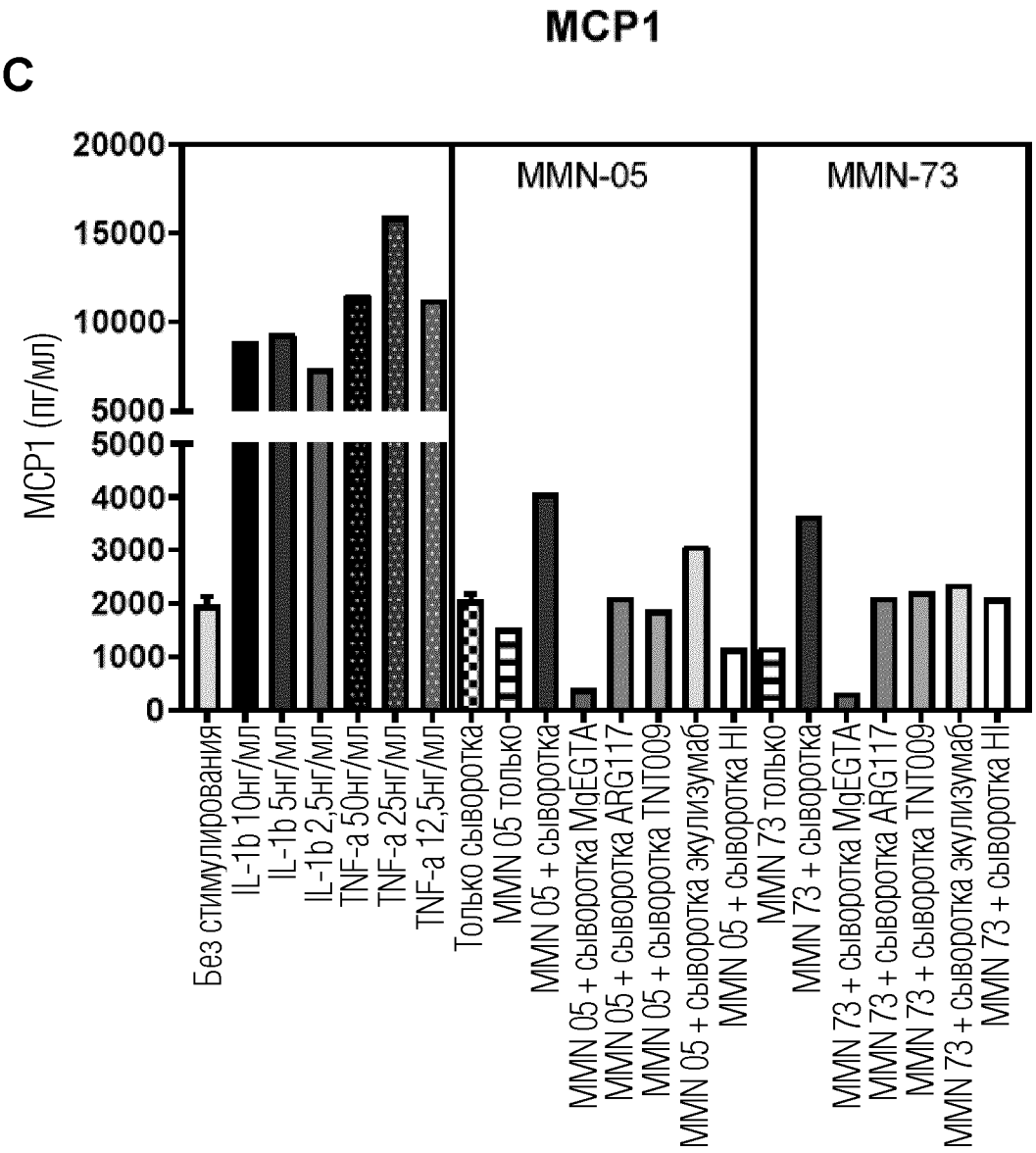
ФИГ. 10


A
C3 фиксация
C3 фиксация (MFI APC)
30000
20000
10000
0
ARGX-117
TNT009
5% сыворотка
EDTA 10мМ
480мкг/мл
160мкг/мл
53мкг/мл
17мкг/мл
6мкг/мл
2мкг/мл
480мкг/мл
160мкг/мл
53мкг/мл
17мкг/мл
6мкг/мл
2мкг/мл
B
Доля ингибирования C3
C3 фиксация (% ингибирования)
100
80
60
40
20
0
ARGX-117
TNT009
5% сыворотка
EDTA 10мМ
480мкг/мл
160мкг/мл
53мкг/мл
17мкг/мл
6мкг/мл
2мкг/мл
480мкг/мл
160мкг/мл
53мкг/мл
17мкг/мл
6мкг/мл
2мкг/мл

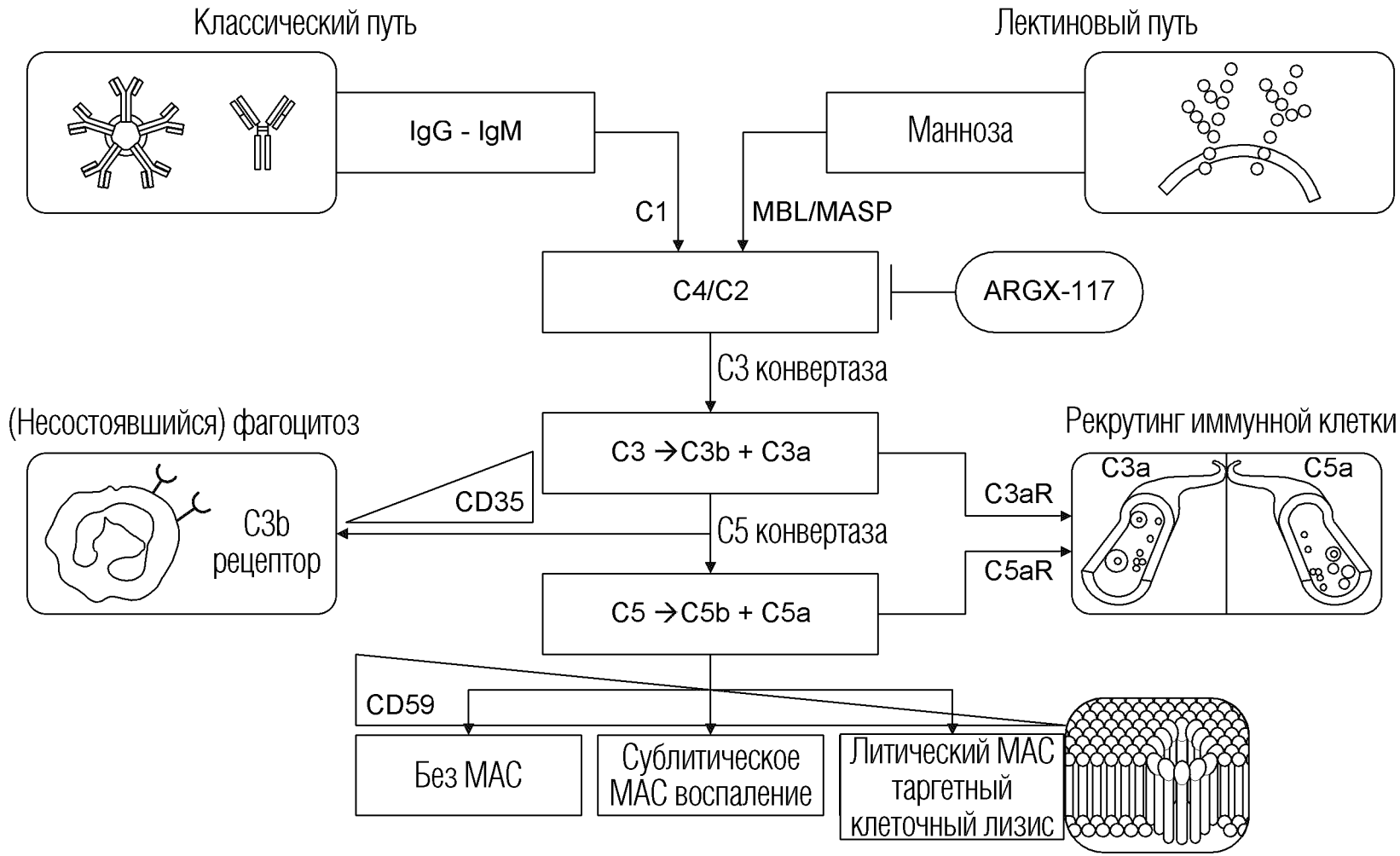
ФИГ. 11


A
IL-6
IL-6 (пг/мл)
8000
6000
4000
2000
1000
800
600
400
200
0
MMN-05
MMN-73
Без стимулирования
IL-1b 10нг/мл
IL-1b 5нг/мл
IL-1b 2,5нг/мл
TNF-a 50нг/мл
TNF-a 25нг/мл
TNF-a 12,5нг/мл
Только сыворотка
MMN 05 только
MMN 05 + сыворотка
MMN 05 + сыворотка MgEGTA
MMN 05 + сыворотка ARG117
MMN 05 + сыворотка TNT009
MMN 05 + сыворотка экулизумаб
MMN 05 + сыворотка HI
MMN 73 только
MMN 73 + сыворотка
MMN 73 + сыворотка MgEGTA
MMN 73 + сыворотка ARG117
MMN 73 + сыворотка TNT009
MMN 73 + сыворотка экулизумаб
MMN 73 + сыворотка HI
B
IL-8
IL-8 (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
500
400
300
200
100
0
MMN-05
MMN-73
Без стимулирования
IL-1b 10нг/мл
IL-1b 5нг/мл
IL-1b 2,5нг/мл
TNF-a 50нг/мл
TNF-a 25нг/мл
TNF-a 12,5нг/мл
Только сыворотка
MMN 05 только
MMN 05 + сыворотка
MMN 05 + сыворотка MgEGTA
MMN 05 + сыворотка ARG117
MMN 05 + сыворотка TNT009
MMN 05 + сыворотка экулизумаб
MMN 05 + сыворотка HI
MMN 73 только
MMN 73 + сыворотка
MMN 73 + сыворотка MgEGTA
MMN 73 + сыворотка ARG117
MMN 73 + сыворотка TNT009
MMN 73 + сыворотка экулизумаб
MMN 73 + сыворотка HI

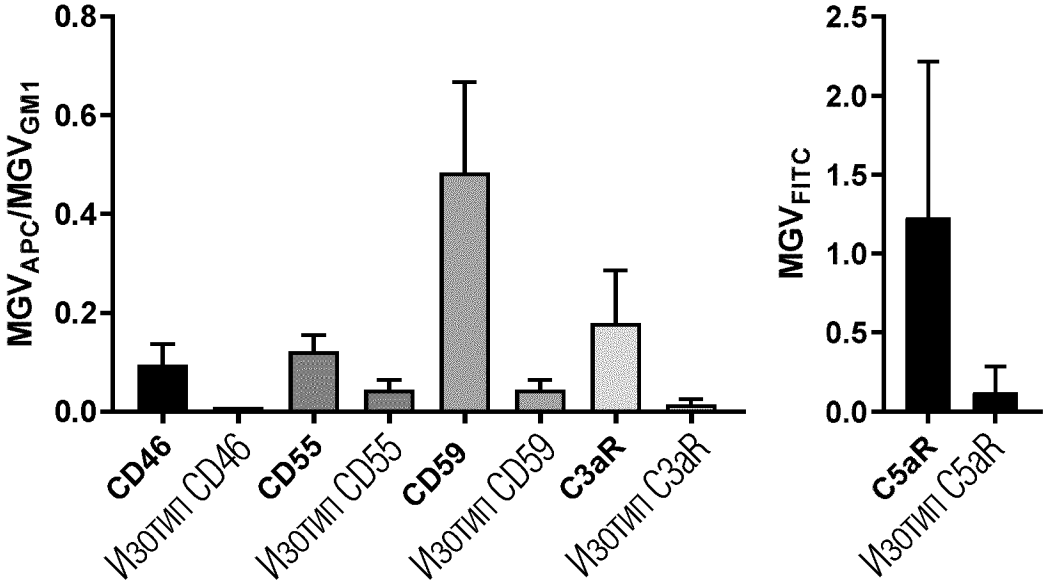
ФИГ. 11 (продолжение)



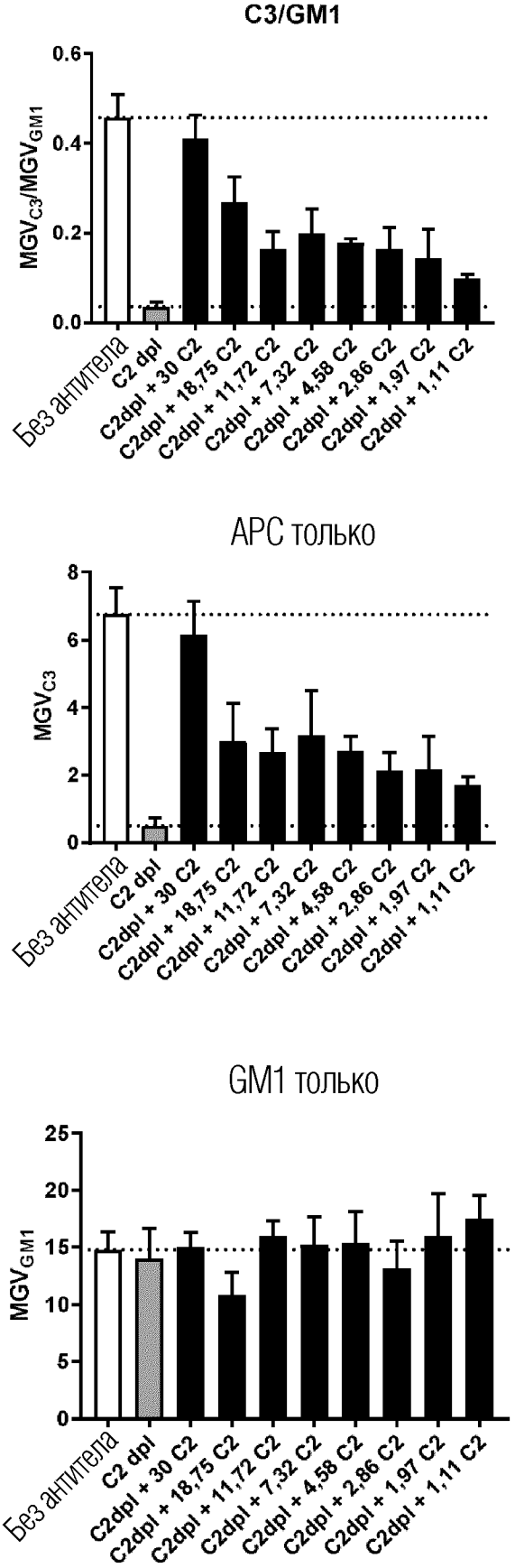
ФИГ. 12


Классический путь
Лектиновый путь
IgG - IgM
Манноза
C1
MBL/MASP
C4/C2
ARGX-117
C3 конвертаза
(Несостоявшийся) фагоцитоз
C3 →C3b + C3a
Рекрутинг иммунной клетки
C3b
рецептор
CD35
C3aR
C5a
C5 конвертаза
C5aR
C5 →C5b + C5a
CD59
Без MAC
Сублитическое
MAC воспаление
Литический MAC
таргетный
клеточный лизис

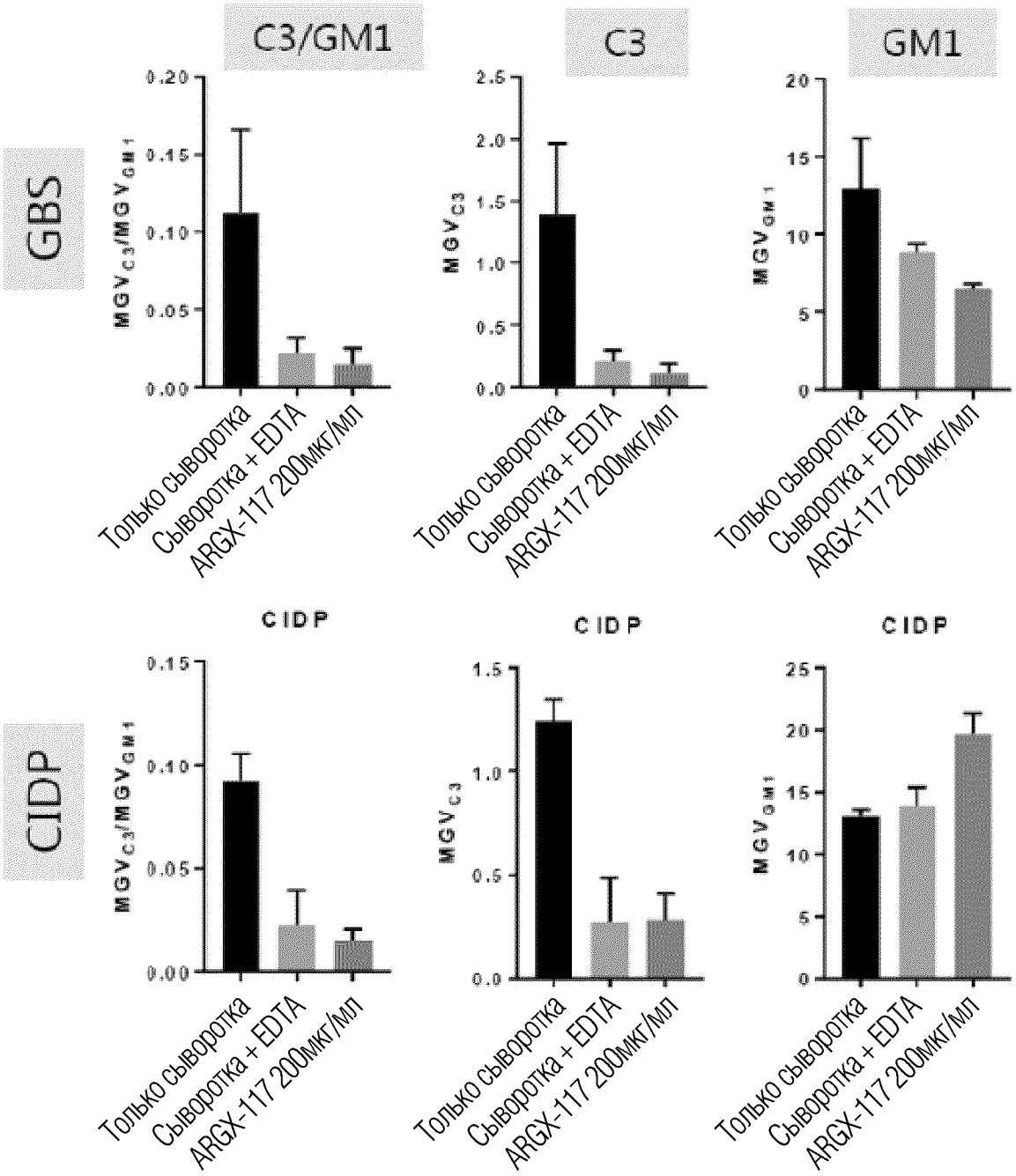
ФИГ. 13


MGV APC/MGV GM1
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CD46
Изотип CD46
CD55
Изотип CD55
CD59
Изотип CD59
C3aR
Изотип C3aR
MGV FITC
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C5aR
Изотип C5aR

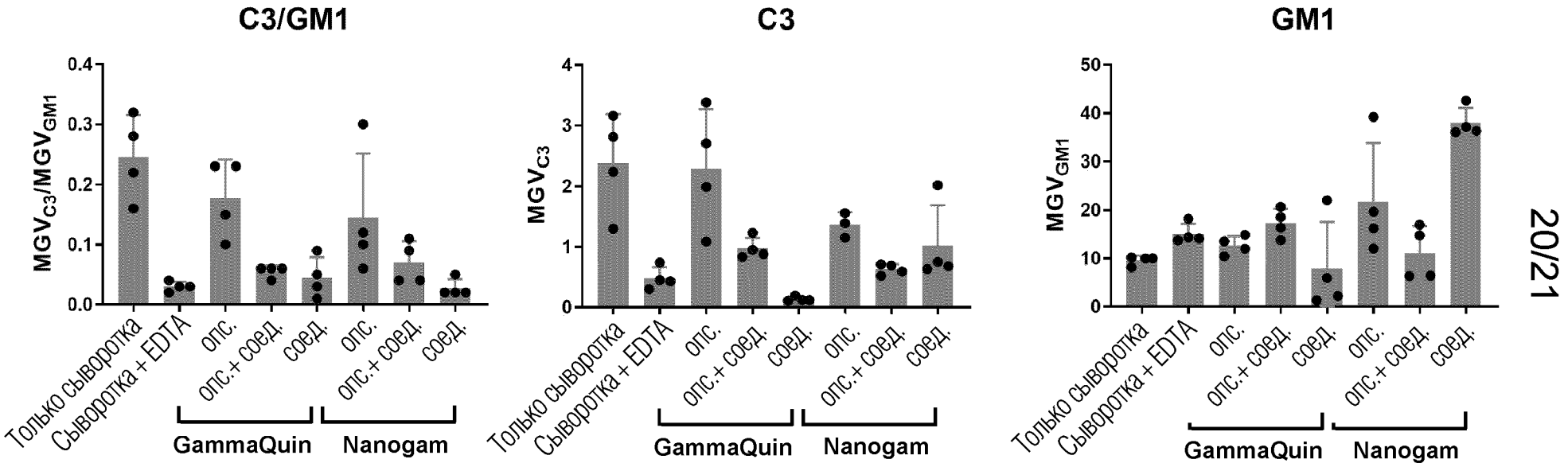
ФИГ. 14


C3/GM1
MGVC3/MGVGM1
0.6
0.4
0.2
0.0
Без антитела
C2 dpl
C2dpl + 30 C2
C2dpl + 18,75 C2
C2dpl + 11,72 C2
C2dpl + 7,32 C2
C2dpl + 4,58 C2
C2dpl + 2,86 C2
C2dpl + 1,97 C2
C2dpl + 1,11 C2
APC только
MGVC3
8
6
4
2
0
Без антитела
C2 dpl
C2dpl + 30 C2
C2dpl + 18,75 C2
C2dpl + 11,72 C2
C2dpl + 7,32 C2
C2dpl + 4,58 C2
C2dpl + 2,86 C2
C2dpl + 1,97 C2
C2dpl + 1,11 C2
GM1 только
MGVGM1
25
20
15
10
5
0
Без антитела
C2 dpl
C2dpl + 30 C2
C2dpl + 18,75 C2
C2dpl + 11,72 C2
C2dpl + 7,32 C2
C2dpl + 4,58 C2
C2dpl + 2,86 C2
C2dpl + 1,97 C2
C2dpl + 1,11 C2

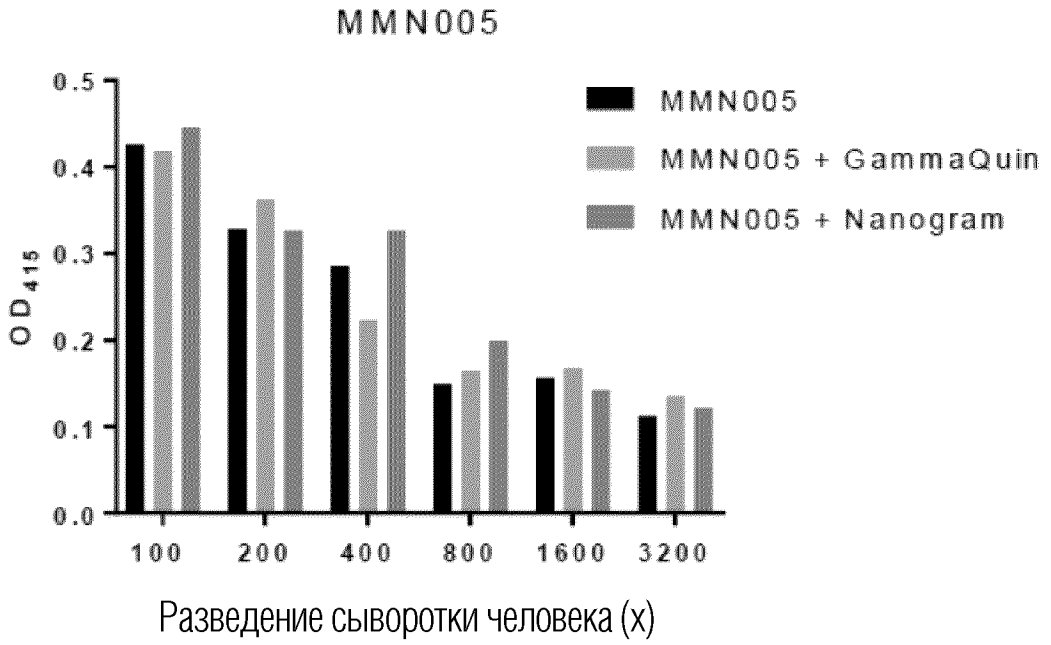
ФИГ. 15

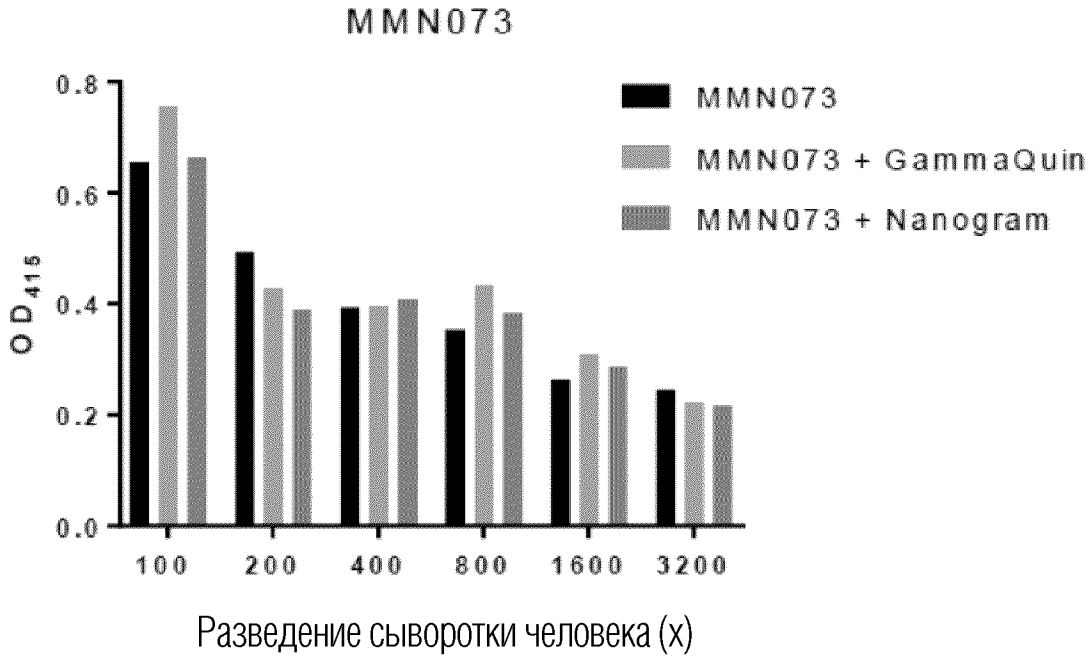

C3/GM1
C3
GM1
GBS
CIDP
MGV C3/MGV GM1
MGV C3
MGV GM1
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
20
15
10
5
0
Только сыворотка
Сыворотка + EDTA
ARGX-117 200мкг/мл

ФИГ. 16


C3/GM1
MGV$_{C3}$/MGV$_{GM1}$
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Только сыворотка
Сыворотка + EDTA
опс.
опс.+ соед.
соед.
опс.
опс.+ соед.
соед.
GammaQuin
Nanogam
C3
MGV$_{C3}$
4
3
2
1
0
Только сыворотка
Сыворотка + EDTA
опс.
опс.+ соед.
соед.
опс.
опс.+ соед.
соед.
GammaQuin
Nanogam
GM1
MGV$_{GM1}$
50
40
30
20
10
0
Только сыворотка
Сыворотка + EDTA
опс.
опс.+ соед.
соед.
опс.
опс.+ соед.
соед.
GammaQuin
Nanogam

ФИГ. 17


MMN005
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD415
100
200
400
800
1600
3200
MMN005
MMN005 + GammaQuin
MMN005 + Nanogram
Разведение сыворотки человека (x)


MMN073
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD415
100
200
400
800
1600
3200
MMN073
MMN073 + GammaQuin
MMN073 + Nanogram
Разведение сыворотки человека (x)