

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292202** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.28

(22) Дата подачи заявки
2020.03.27

(51) Int. Cl. *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) **ИНГИБИТОРЫ C5a ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

(86) PCT/EP2020/058878

(87) WO 2021/190770 2021.09.30

(71) Заявитель:
ИНФЛАРКС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

**Ридеманн Нильс К. (DE), Го Жэньфэн
(US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к ингибитору активности C5a при медицинском состоянии, вызванном или ассоциированном с инфекцией коронавирусом. Настоящее изобретение также относится к применению ингибитора активности C5a при уменьшении воспалительного ответа у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией. Настоящее изобретение дополнительно относится к ингибитору активности C5a для применения при улучшении функции органа, в частности функции легких и/или функции печени, у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

A1

202292202

202292202

A1

Ингибиторы C5a для лечения коронавирусной инфекции

Настоящее изобретение относится к ингибитору активности C5a при медицинском состоянии, вызванном или ассоциированном с инфекцией коронавирусом, причем указанное медицинское состояние предпочтительно представляет собой (i) пневмонию и/или (ii) лихорадку. Настоящее изобретение также относится к применению ингибитора активности C5a при уменьшении воспалительного ответа у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией. Настоящее изобретение дополнительно относится к ингибитору активности C5a для применения при улучшении функции органа, в частности, функции легких и/или функции печени, у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

C5a

Пептид C5a отщепляется от C5 при активации комплемента. Из всех продуктов активации комплемента C5a является одним из наиболее активных провоспалительных пептидов с широким спектром функций (Guo RF, and Ward PA. 2005. Annu. Rev. Immunol. 23:821-852). C5a представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 11,2 кДа, который присутствует в крови здоровых людей. Полипептидная часть C5a содержит 74 аминокислоты, молекулярная масса которых составляет 8,2 кДа, в то время как углеводная часть составляет приблизительно 3 кДа. C5a действует посредством высокоаффинных рецепторов C5a (C5aR и C5L2) (Ward PA. 2009. J. Mol. Med. 87(4):375-378). C5aR принадлежит к семейству рецепторов, связанных с G-белком, родопсинового типа с семью трансмембранными сегментами; C5L2 аналогичен C5aR, но не связан с G-белком. В настоящее время полагают, что C5a выполняет свои биологические функции в первую очередь за счет взаимодействия C5a-C5aR, поскольку для взаимодействия C5a-C5L2 было обнаружено лишь несколько видов биологического ответа. C5aR широко экспрессируется на миелоидных клетках, включая нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты, а также на немиелоидных клетках во многих органах, в частности, в легких и печени, что указывает на важность передачи сигналов с участием C5a/C5aR. C5a обладает множеством биологических функций (Guo and Ward, 2005, см. выше). C5a является сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, а также обладает хемотаксической активностью в отношении моноцитов и макрофагов. C5a вызывает окислительный взрыв (потребление O₂) в нейтрофилах и усиливает фагоцитоз и высвобождение ферментов из гранул. Также было установлено, что C5a обладает сосудорасширяющим действием. Было показано, что C5a участвует в модуляции экспрессии цитокинов в различных типах клеток

для усиления экспрессии молекул адгезии на нейтрофилах. Было установлено, что C5a оказывает крайне нежелательное действие при чрезмерной продукции при патологических состояниях, поскольку он является сильным индуктором и стимулятором воспалительных ответов, который функционирует на более ранних этапах цепочки воспалительных реакций. Высокие дозы C5a могут привести к неспецифичной хемотаксической «десенсбилизации» нейтрофилов, вызывая тем самым обширное нарушение функций (Huber-Lang M et al. 2001. J. Immunol. 166(2):1193-1199).

Как сообщалось, C5a вызывает многочисленные провоспалительные ответы. Например, C5a стимулирует синтез и высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, и ингибирующего миграцию макрофагов фактора (MIF) из лейкоцитов человека (Hopken U et al. 1996. Eur J Immunol 26(5):1103-1109; Riedemann NC et al. 2004. J Immunol 173(2):1355-1359; Strieter RM et al. 1992. Am J Pathol 141(2):397-407). C5a совместно с ЛПС оказывает сильное синергическое действие на выработку ФНО- α , макрофагального воспалительного белка (MIP)-2, цитокин-индуцированного хемоаттрактанта нейтрофилов (CINC)-1 и ИЛ-1 β в клетках эпителия альвеол (Riedemann NC et al. 2002. J. Immunol. 168(4):1919-1925; Rittirsch D et al. 2008. Nat Rev Immunol 8(10):776-787).

Также было доказано, что блокада C5a приводит к защитному эффекту в экспериментальных моделях сепсиса и во многих других моделях воспаления, таких как повреждение в результате ишемии/реперфузии, заболевание почек, отторжение трансплантата, малярия, ревматоидный артрит, инфекционное заболевание кишечника, воспалительное заболевание легких, аутоиммунные заболевания, сходные с волчанкой, нейродегенеративное заболевание и т.д., у животных различных видов, которые частично рассматриваются в Klos A. et al (Klos A. et al. 2009. Mol Immunol 46(14):2753-2766) и Allegretti M. et al (Allegretti M et al. 2005. Curr Med Chem 12(2):217-236). Также недавно было установлено, что блокада C5a обеспечивает значительный терапевтический эффект в модели опухоли у мышей (Markiewski MM et al. 2008. Nat Immunol 9(11):1225-1235).

Коронавирусная инфекция

За последние десятилетия во всем мире произошли вспышки различных коронавирусов, из которых, в частности, три вида вируса привели к заболеваниям с высокими показателями смертности. Тяжелый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS) и недавно возникшее заболевание коронавирусом 2019 (COVID-19). Коронавирус, ответственный за эти вспышки, представлял собой SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, соответственно.

Вспышка заболевания коронавирусом 2019 (COVID-19), вызванная новым коронавирусом 2019, также известным как коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2), была впервые идентифицирована в Ухане, провинция Хубэй, Китай, в декабре 2019 года и с тех пор стала серьезной угрозой общественному здравоохранению [Chen et al. 2020; medRxiv, 2020: p. 2020.02.16.20023903; Chen et al [2] 2020, The Lancet, 2020. 395(10223): p. 507-513; Yu et al 2020, Microbes and Infection, 2020. 22(2): p. 74-79]. В Китае показатель смертности по состоянию на 23 марта 2020 года составляет 4,02%, что учитывает как показатель смертности 4,66% в провинции Хубэй, так и показатель смертности 0,89% за пределами провинции Хубэй. Считается, что гораздо более низкий показатель смертности за пределами провинции Хубэй в основном обусловлен улучшенным медицинским обслуживанием, включая раннюю диагностику и своевременную и улучшенную медицинскую помощь [Zhao et al, medRxiv, 2020: p. 2020.03.17.20037572]. В странах за пределами Китая имеется устойчивая передача инфекции. Поскольку COVID-19 продолжает распространяться, потребность в различных уровнях медицинской помощи резко возрастет. Таким образом, для эффективного уменьшения показателя смертности медикаментозное лечение должно быть сосредоточено на предотвращении развития обычной (легкой) вирусной пневмонии в тяжелую форму и развития тяжелой пневмонии в критическое болезненное состояние или ОРДС.

COVID-19 может иметь признаки длительной бессимптомной латентности, что может быть основным фактором, способствующим относительно высокой трансмиссивности по сравнению с другими ранее возникавшими смертельными коронавирусными инфекциями, тяжелым острым респираторным синдромом (SARS) и ближневосточным респираторным синдромом (MERS). Пациенты, страдающие COVID-19, обычно имеют гриппоподобные симптомы, такие как лихорадка или признаки болезни нижних дыхательных путей, включая сухой кашель и одышку [Chen et al [2] выше; Chang et al JAMA, 2020; Wang et al. AMA, 2020; Xiao et al Journal of Medical Virology, 2020]. В соответствии с анализом Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) Соединенных Штатов время инкубации до появления симптомов, по оценкам, составляет приблизительно 2-14 дней после воздействия вируса. При прогрессировании заболевания в тяжелую форму оно часто влияет на функции нескольких органов, включая легкие, сердце, печень и систему свертывания, помимо прочего [Liu et al medRxiv, 2020: p. 2020.02.10.20021584; Fan et al. medRxiv, 2020: p. 2020.02.26.20026971; Tang et al Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2020.]. Таким образом, смерть обычно вызвана дыхательной недостаточностью и дисфункциями нескольких органов, сходно с сепсисом,

индуцированным другими вирусными пневмониями [Zhang et al medRxiv, 2020: p. 2020.02.26.20028191]. Сепсис и ОРДС чаще всего возникают на второй неделе после начала заболевания; битва за жизнь часто происходит на третьей неделе тяжелой болезни [Zhou et al The Lancet, 2020].

5 Накопленные данные указывают на то, что пожилой возраст, первопричинные состояния здоровья (например, сердечно-сосудистые проблемы) и ослабленные иммунные системы являются важными факторами риска для потенциального развития более тяжелой формы начала заболевания и худших исходов [Huang et al The Lancet, 2020. 395(10223): p. 497-506]. Три основных сопутствующих заболевания наряду с COVID-19, которые
10 ассоциированы с высоким показателем смертности, представляют собой гипертонию, диабет и ишемическую болезнь сердца [Zhou et al выше]. Существует неотложная потребность в разработке безопасной и эффективной стратегии лечения пациентов, имеющих COVID-19, в частности, тех, которые имеют вышеупомянутые факторы риска или сопутствующие заболевания.

15 COVID-19 стал серьезной угрозой для здоровья человечества, в частности, для пожилых людей. COVID-19 может характеризоваться двойным воздействием вирусного воспаления и иммуноопосредованного поражения. Основываясь на доклинических, а также клинических результатах, описанных в настоящей заявке, авторы настоящего изобретения предполагают, что при прогрессировании коронавирусной инфекции, в
20 частности, COVID-19, возникает такое событие как патогенный «шторм комплемента». Блокада с помощью терапии, направленной против C5a, предлагает эффективное терапевтическое действие в моделях на животных и предварительном тестировании у пациентов, страдающих COVID-19. Подход, направленный против C5a, представляет собой конкурентоспособную стратегию в борьбе с COVID-19 у пациентов с
25 прогрессирующими/ухудшающимися легкими формами, а также тяжелыми формами заболевания.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Одна из проблем, лежащих в основе настоящего изобретения, заключалась в обеспечении терапевтических подходов к лечению пневмонии, вызванной новым вирусом SARS-CoV2.

До сих пор не были проведены исследования эффективности лечения, направленного против C5a, в лечении пневмонии, вызванной коронавирусом, не говоря уже о штаммах с высокой смертностью SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.

Авторы настоящей заявки применили IFX-1, высокоэффективное нейтрализующее моноклональное антитело (МАТ) против С5а человека, чтобы изучить терапевтический потенциал ингибирования комплемента в лечении тяжелой пневмонии, индуцированной вирусом H7N9. Насколько известно авторам настоящего изобретения, впервые было
5 исследовано направленное против С5а лечение пневмонии и ассоциированных симптомов у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

Данные, раскрытые в экспериментальной части ниже, демонстрируют, что при инфекции различными типами коронавирусов, включая SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, происходит чрезмерная активация комплемента.

10 Авторы настоящего изобретения обнаружили, что лечение, направленное против С5а, у пациентов, представляющих собой людей, инфицированных SARS-CoV-2, в значительной степени ослабляло основные симптомы COVID-19, то есть уменьшало лихорадку, улучшало количество лимфоцитов, уменьшало уровни СРБ и улучшало функцию органов, в частности, функцию легких и печени, о чем свидетельствует
15 нормализация оксигенации крови и уровней АЛТ/АСТ. Все эти эффекты наблюдали с быстрой нормализацией состояния после применения лечения, направленного против С5а.

Кроме того, авторы настоящего изобретения раскрывают множество экспериментов, которые обеспечивают понимание механизмов того, как инфекция различными штаммами коронавируса приводит к обширной активации комплемента.

20 Эти результаты позволяют предположить, что ингибирование комплемента, в частности, ингибирование С5а, является весьма перспективной стратегией для лечения заболевания, вызванного коронавирусом, в частности, респираторных синдромов, вызванных коронавирусом.

Приведенный выше обзор не обязательно описывает все преимущества настоящего
25 изобретения и задачи, которые можно решить с его помощью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности С5а для применения при лечении медицинского состояния, вызванного или
30 ассоциированного с инфекцией коронавирусом, причем указанное медицинское состояние предпочтительно представляет собой (i) пневмонию и/или (ii) лихорадку.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности С5а для применения при уменьшении воспалительного ответа у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности C5a для применения при улучшении функции органа, в частности, функции легких и/или функции печени, у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Прежде чем настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение.

Предпочтительно термины, используемые в настоящем описании, определены, как описано в глоссарии «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010, Basel, Switzerland).

Во всем описании настоящего изобретения, включая следующую за ним формулу изобретения, если из контекста не следует иное, слово «включать» («содержать») и варианты, такие как «включает» («содержит») и «включающий» («содержащий»), подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий.

В тексте настоящего описания цитируется несколько документов (например, патенты, заявки на патенты, научные публикации, описания производителя, инструкции, представленные последовательности базы генетических данных (англ. GenBank Accession Number) и т. д.). Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому описанию в силу предшествующего изобретения. Некоторые из документов, цитируемых в настоящем описании, характеризуются как «включенные посредством ссылки». В случае противоречия между определениями или положениями таких включенных ссылок и

определениями или положениями, приведенными в настоящем описании, приоритет имеет текст настоящего описания.

Последовательности: Все последовательности, упомянутые в настоящем описании, раскрыты в прилагаемом перечне последовательностей, который со всем своим содержанием и раскрытием является частью этого описания.

В контексте настоящего изобретения C5a, в частности, относится к человеческому C5a. Человеческий C5a представляет собой пептид из 74 аминокислот со следующей аминокислотной последовательностью:

TLQKKIEEIA AKYKHSVVKK CCYDGACVNN DETCEQRAAR ISLGPRCІKA
FTECCVVASQ LRANISHKDM QLGR (SEQ ID NO: 1).

Аминокислотная последовательность человеческого C5 может быть найдена под номером доступа UniProtKB P01031 (CO5_HUMAN).

Термин «ингибитор активности C5a» в настоящем описании означает любое соединение, которое каким-либо образом снижает активность C5a. Это снижение активности может быть достигнуто путем прямого или косвенного снижения концентрации C5a, или путем снижения активности C5a, или путем предотвращения того, что C5a оказывает свое воздействие на один или несколько его рецепторов (например, на C5aR или C5L2), или путем снижения концентраций или активности одного или нескольких рецепторов C5a.

В контексте настоящего изобретения выражение «рецептор C5a» относится к любому потенциальному лиганду, связывающему C5a на поверхности клетки, особенно к любому рецепторному белку, с которым C5a может связываться и вызывать реакцию на указанном рецепторе (например, активацию или ингибирование рецептора). Термин «рецептор C5a», в частности, охватывает два рецептора C5aR и C5L2. Альтернативные названия для C5aR – C5aR1 и CD88. Альтернативное название для C5L2 – C5aR2.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к ингибитору C5a, который влияет на рецептор C5a (например, связываясь с рецептором C5a или блокируя экспрессию рецептора C5a). В данном контексте термин «рецептор C5a» может относиться к (i) C5aR, или к (ii) C5L2, или (iii) как к C5aR, так и к C5L2. Это означает, что некоторые ингибиторы C5a влияют только на один из рецепторов (то есть либо на C5aR, либо на C5L2), в то время как другие ингибиторы C5a влияют на оба рецептора C5a (то есть как на C5aR, так и на C5L2).

В контексте настоящего изобретения выражение «белковый лиганд» относится к любой молекуле, состоящей из аминокислот, соединенных пептидными связями, независимо от общего размера молекулы, которая способна специфически связываться с

другой молекулой. Соответственно, выражение «белковый лиганд» включает олигопептиды (≤ 100 аминокислот) и полипептиды (> 100 аминокислот). Выражение «белковый лиганд» также включает циклические пептиды независимо от их размера. Выражение «белковый лиганд», в частности, охватывает антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, антителоподобные белки и пептидомиметики.

Используемый в настоящем описании термин «первое соединение» (например, белковый лиганд или аптамер нуклеиновой кислоты) считается «связывающимся» со вторым соединением (например, целевым белком), если его константа диссоциации K_d с указанным вторым соединением составляет 1 мМ или менее, предпочтительно 100 мкМ или менее, предпочтительно 50 мкМ или менее, предпочтительно 30 мкМ или менее, предпочтительно 20 мкМ или менее, предпочтительно 10 мкМ или менее, предпочтительно 5 мкМ или менее, более предпочтительно 1 мкМ или менее, более предпочтительно 900 нМ или менее, более предпочтительно 800 нМ или менее, более предпочтительно 700 нМ или менее, более предпочтительно 600 нМ или менее, более предпочтительно 500 нМ или менее, более предпочтительно 400 нМ или менее, более предпочтительно 300 нМ или менее, более предпочтительно 200 нМ или менее, еще более предпочтительно 100 нМ или менее, еще более предпочтительно 90 нМ или менее, еще более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более предпочтительно 70 нМ или менее, еще более предпочтительно 60 нМ или менее, еще более предпочтительно 50 нМ или менее, еще более предпочтительно 40 нМ или менее, еще более предпочтительно 30 нМ или менее, еще более предпочтительно 20 нМ или меньше и еще более предпочтительно 10 нМ или менее.

Термин «связывание» согласно настоящему изобретению предпочтительно относится к специфическому связыванию. «Специфическое связывание» означает, что соединение (например, белковый лиганд или аптамер нуклеиновой кислоты) сильнее связывается с мишенью, такой как эпитоп, для которой оно специфично, по сравнению со связыванием с другой мишенью. Соединение с первой мишенью сильнее связывается, чем со второй мишенью, если оно связывается с первой мишенью с константой диссоциации (K_d), которая ниже, чем константа диссоциации для второй мишени. Предпочтительно константа диссоциации (K_d) для мишени, с которой соединение связывается специфически, более чем в 10 раз, предпочтительно более чем в 20 раз, более предпочтительно более чем в 50 раз, еще более предпочтительно более чем в 100 раз, в 200 раз, в 500 раз или в 1000 раз ниже, чем константа диссоциации (K_d) для мишени, с которой соединение связывается не специфически.

Термин «Kd» (обычно измеряется в «моль/л», что иногда сокращенно обозначают как «M») в настоящем описании означает константу равновесия при диссоциации конкретного взаимодействия между соединением (например, белковым лигандом) и молекулой-мишенью.

5 Методы определения аффинности связывания соединений, то есть определения константы диссоциации Kd, известны специалисту в данной области техники и могут быть выбраны, например, из следующих методов, известных в данной области техники: технология поверхностного плазмонного резонанса (англ. Surface Plasmon Resonance, SPR), биослойная интерферометрия (англ. Bio-layer interferometry, BLI),
10 иммуноферментный анализ (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), проточная цитометрия, изотермическая титрационная калориметрия (англ. isothermal titration calorimetry, ИТС), аналитическое ультрацентрифугирование, радиоиммуноанализ (англ. Radioimmunoassay, RIA или IRMA) и усиленная хемилюминесценция (англ. enhanced chemiluminescence, ECL). Как правило, константа диссоциации Kd определяется
15 при 20°C, 25°C, 30°C или 37°C. Если конкретно не указано иное, значения Kd, приведенные в настоящей заявке, определяют при 20°C с помощью ИФА.

«Эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, является частью макромолекулы, которая распознается иммунной системой, в частности, антителами, В-клетками или Т-клетками. В настоящей заявке термин «эпитоп» означает часть
20 макромолекулы, способную связываться с соединением (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом), как описано в настоящей заявке. В этом контексте термин «связывание» предпочтительно относится к специфичному связыванию. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные
25 характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы можно отличить тем, что у первых связывание теряется в присутствии денатурирующих растворителей, в отличие от вторых.

«Паратоп» - это часть антитела, которая связывается с эпитопом. В контексте настоящего изобретения «паратоп» представляет собой часть соединения (например,
30 белкового лиганда), как описано в настоящей заявке, которая связывается с эпитопом.

Термин «антитело» обычно относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Термин «антитело» также включает все рекомбинантные формы антител, в частности антител, описанных в настоящей заявке,
35 например, антитела, экспрессируемые в прокариотах, негликозилированные антитела,

антитела, экспрессируемые в эукариотах (например, клетках линии CHO), гликозилированные антитела и любые фрагменты и производные антигенсвязывающих антител, как описано ниже. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VH или VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как VL или VL) и константной области легкой цепи. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (от англ. complementarity determining regions, CDR), перемежающимися с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (от англ. framework regions, FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «связывающая часть») в настоящем описании означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагменты, одновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) F(ab')₂ -фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), которые состоят из домена VH; (vi) выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR), и (vii) комбинации двух или более выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть образованными в виде единой белковой цепи, в которой VL и VH-области образуют пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et

al. (1988) *Science* 242: 423-426; and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Следующим примером является слитый белок связывающего домена иммуноглобулина, содержащий (i) полипептид связывающего домена, который слит с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с шарнирной областью, и (iii) константную область CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с константной областью CH2. Полипептид связывающего домена может быть переменной областью тяжелой цепи или переменной областью легкой цепи. Слитые белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Другими примерами «антигенсвязывающих фрагментов» являются так называемые микроантитела, которые получены из отдельных CDR. Например, Hear et al., 2005, описали микроантитело из 17 аминокислотных остатков, полученное из CDR3 тяжелой цепи антитела, направленного против гликопротеина оболочки gp120 ВИЧ-1 (Hear C.J. et al. (2005) *Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody*. *J. Gen. Virol.* 86:1791-1800). Другие примеры включают малые миметики антител, содержащие два или более участка CDR, которые слиты друг с другом, предпочтительно с помощью родственных каркасных областей. Такой малый миметик антитела, содержащий CDR1 VH и CDR3 VL, связанные когнатным FR2 VH, был описан Qiu et al., 2007 (Qiu X.-Q. et al. (2007) *Small antibody mimetics comprising two complementary-determining regions and a framework region for tumor targeting*. *Nature biotechnology* 25(8):921-929).

Таким образом, термин «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего описания относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифично связывает антиген. Также включены иммуноглобулиноподобные белки, которые отбираются с помощью методик, включая, например, фаговый дисплей для специфического связывания с молекулой-мишенью или эпитопом-мишенью. Молекулы иммуноглобулина в настоящем изобретении могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, предпочтительно IgG2a и IgG2b, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела или фрагменты происходят от человека, шимпанзе, грызуна (например, мыши, крысы, морской свинки или кролика), курицы, 5 индейки, свиньи, овцы, козы, верблюда, коровы, лошади, осла, кошки или собаки. Особенно предпочтительно, чтобы антитела имели человеческое или мышинное происхождение. Антитела для применения в настоящем изобретении также включают химерные молекулы, в которых константная область антитела, полученная из одного вида, предпочтительно человека, объединена с антигенсвязывающим сайтом, полученным из 10 другого вида, например, мыши. Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению включают гуманизированные молекулы, в которых антигенсвязывающие сайты антитела, полученные от нечеловеческого вида (например, от мыши), объединены с константными и каркасными областями человеческого происхождения.

Как показано в настоящем описании в качестве примера, антитела в настоящем 15 изобретении могут быть получены непосредственно из гибридом, которые экспрессируют антитело, или могут быть клонированы и рекомбинантно экспрессированы в клетке-хозяине (например, клетке СНО или лимфоцитарной клетке). Дополнительными примерами клеток-хозяев являются микроорганизмы, такие как *E.coli*, и грибы, такие как дрожжи. В качестве альтернативы они могут быть получены рекомбинантно из 20 трансгенного животного, не являющегося человеком, или растения.

Термин «химерное антитело» относится к тем антителам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелых и легких цепей гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу, тогда как оставшийся сегмент цепи 25 гомологичен соответствующим последовательностям другого вида или класса. Обычно переменная область легкой и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных от одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных из другого. Одно явное преимущество таких химерных форм состоит в том, что переменную область можно легко получить из 30 известных в настоящее время источников, используя легкодоступные В-клетки или гибридомы из организмов-хозяев, не являющихся человеком, в сочетании с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека. В то время как переменная область имеет преимущество в простоте получения, и источник не влияет на специфичность, константная область, являющаяся человеческой, с меньшей вероятностью 35 вызывает иммунный ответ от человека, когда вводятся антитела, чем константная область

от нечеловеческого источника. Однако определение не ограничивается этим конкретным примером.

Термин «гуманизированное антитело» относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий сайт, который в основном происходит от иммуноглобулина из нечеловеческого вида, при этом остальная часть структуры молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полные переменные домены, слитые с константными доменами, либо только участки, определяющие комплементарность (CDR), привитые на соответствующие каркасные участки в переменных доменах. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами, например, модифицированный, чтобы больше походить на человеческие иммуноглобулины. Некоторые формы гуманизированных антител сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антитела мыши). Другие формы имеют один или несколько CDR, которые изменены относительно исходного антитела.

Специалистам в данной области известны различные способы гуманизации антител, которые были рассмотрены Almagro и Fransson, в 2008 году, *Frontiers in Bioscience*, 13: 1619-1633, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Обзорная статья Almagro и Fransson кратко изложена в национальной заявке US 2012/0231008 A1 международной заявки WO 2011/063980 A1. Содержание US 2012/0231008 A1 и WO 2011/063980 A1 включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

Термин «антитела человека» в настоящем описании означает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека в настоящем изобретении могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Антитела человека в настоящем изобретении включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или животных, трансгенных для одного или нескольких человеческих иммуноглобулинов и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США No. 5,939,598, выданном Kucherlapati и Jakobovits.

Термин «моноклональное антитело» в настоящем описании означает препарат молекул антитела одного молекулярного состава. Моноклональное антитело

демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. В одном варианте реализации моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от нечеловеческого животного, например, мыши, слитой с иммортализованной клеткой.

5 Термин «рекомбинантное антитело» в настоящем описании включает все антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как (а) антитела, выделенные от животного (например, мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными в отношении к генам иммуноглобулина или гибридоме, полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы (с) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

10 Термин «трансфектома» в настоящем описании включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки СНО, клетки NS/0, клетки НЕК293, клетки НЕК293Т, клетки растений или грибов, включая клетки дрожжей.

15 Термин «гетерологичное антитело» в настоящем описании означает трансгенный организм, продуцирующий такое антитело. Данный термин относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую последовательности, обнаруженной в организме, не являющемся трансгенным организмом, и, как правило, происходящем из вида, отличного от трансгенного организма.

20 Термин «гетерогибридное антитело» в настоящем описании относится к антителу, содержащему легкие и тяжелые цепи различного происхождения. Например, антитело, содержащее тяжелую цепь человека, связанную с легкой цепью мыши, представляет собой гетерогибридное антитело.

25 Таким образом, «антитела и их антигенсвязывающие фрагменты», подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, моновалентные, биспецифичные, гетероконъюгатные, мультиспецифичные, рекомбинантные, гетерологичные, гетерогибридные, химерные, гуманизированные (в частности, CDR-привитые), деиммунизированные или человеческие антитела, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, Fd, Fv, дисульфид-связанные Fvs (dsFv),

одноцепочечные антитела (например, scFv), диатела или тетратела (Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448), нанотела (также известные как однодоменные антитела), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам, описанным в настоящей заявке) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанного.

Антитела, описанные в настоящей заявке, предпочтительно являются выделенными. Термин «выделенное антитело» в настоящем описании относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих различной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с C5a, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от C5a). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом C5a человека, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, из других видов (например, гомологи C5a у другого вида, например, крысиный C5a). Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободным от других клеточных материалов и/или химических веществ. В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинация «выделенных» моноклональных антител относится к антителам, обладающим различной специфичностью и объединенным в четко определенную композицию.

Термин «встречающийся в природе» в настоящем описании означает объект, который можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, представляет собой встречающуюся в природе последовательность.

В настоящей заявке термин «аптамер нуклеиновой кислоты» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована посредством повторных циклов отбора *in vitro* или SELEX (систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения) для связывания с молекулой-мишенью (см. обзор: Brody E.N. and Gold L. (2000), Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. J. Biotechnol. 74(1):5-13). Аптамер нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу ДНК или РНК. Аптамеры могут содержать модификации, например, модифицированные нуклеотиды, такие как 2'-фторзамещенные пиримидины, и/или могут содержать один или несколько нуклеотидов с L-рибозными единицами (или L-дезоксирибозой) вместо стандартных единиц D-рибозы (или единиц D-дезоксирибозы).

В настоящей заявке термин «антителоподобный белок» относится к белку, который был сконструирован (например, путем мутагенеза петель) для специфического связывания с молекулой-мишенью. Как правило, такой антителоподобный белок содержит по меньшей мере одну переменную пептидную петлю, присоединенную на обоих концах к каркасу белка. Это двойное структурное ограничение значительно увеличивает аффинность связывания антителоподобного белка до уровней, сопоставимых с антителами. Длина переменной пептидной петли обычно составляет от 10 до 20 аминокислот. Каркасный белок может представлять собой любой белок, имеющий хорошие характеристики растворимости. Предпочтительно каркасный белок представляет собой небольшой глобулярный белок. Антителоподобные белки включают, без ограничения, аффитела, аффилины, аффимеры, аффитины, альфатела, антикалины, авимеры, DARP-ины (сконструированные белки с анкириновым повтором), финомеры, пептиды домена Куница и монотела (см. обзор: Binz H.K. et al. (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat. Biotechnol. 23(10):1257-1268). Антителоподобные белки могут быть получены из больших библиотек мутантов, например, могут быть получены с помощью пэннинга из больших библиотек фагового дисплея и могут быть выделены по аналогии с обычными антителами. Также антителоподобные связывающие белки могут быть получены путем комбинаторного мутагенеза поверхностно-экспонированных остатков в глобулярных белках. Антителоподобные белки иногда называют «пептидными аптамерами» или «миметиками антител».

Термин «пептидомиметик» в настоящем описании означает небольшую белкоподобную цепь, предназначенную для имитации пептида. Пептидомиметики обычно возникают в результате модификации существующего пептида с целью изменения свойств молекулы. Например, они могут возникать в результате модификаций для изменения стабильности молекулы или биологической активности. Это может играть роль в разработке соединений, подобных лекарственным средствам, из существующих пептидов. Эти модификации включают изменения в пептиде, которые не встречаются в природе (такие как измененные основные цепи и включение не встречающихся в природе аминокислот).

В контексте настоящего изобретения термин «малая молекула» относится к молекуле с молекулярной массой 2 кДа или менее, предпочтительно с молекулярной массой 1 кДа или менее. Термин «малая молекула», в частности, относится к молекулам, которые не являются ни олигопептидами, ни олигонуклеотидами.

В контексте настоящего изобретения общее выражение «причем А конкурирует с В за связывание с С» (например, в выражении «*причем указанное антитело или его*

антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (а), за связывание с C5a») используется для определения свойств связывания соединения, указанного в позиции А. Указанное соединение А связывается с С, и соединение В также связывается с С, но соединение А и соединение В не могут связываться с С одновременно; т.е. А и В связываются с одним и тем же эпитопом (или по меньшей мере с перекрывающимися эпитопами) на С. Такая конкуренция в связывании может быть определена с помощью конкурентного ELISA или с помощью технологии на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или с помощью любого из других методов, перечисленных выше в контексте определения аффинности связывания. Если прямо не указано иное, свойства конкурентного связывания соединения определяют с помощью ИФА при 20°C с использованием эквимольных концентраций двух конкурирующих соединений.

IFX-1 (альтернативное название: CaCP29; InflaRx GmbH, Германия) представляет собой антитело, специфично связывающееся с C5a. Последовательности CDR и последовательности FR IFX-1 раскрыты в WO 2015/140304 A1 (в Таблице 3), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Он содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 34 и последовательность вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 359.

INab708 (InflaRx GmbH, Германия) представляет собой другое антитело, специфично связывающееся с C5a. Последовательности CDR и последовательности FR INab708 также раскрыты в WO 2015/140304 A1 (в Таблице 3), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Он содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 36 и последовательность вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 37.

MEDI-7814 (МедИммун) представляет собой рекомбинантное гуманизованное антитело к C5a. Кристаллическая структура человеческого C5a в комплексе с MEDI7814 доступна в Банке Белковых Данных RCSB под номером доступа 4UU9 (DOI: 10.2210/pdb4uu9/pdb).

ALXN-1007 (Алексион) представляет собой гуманизованное антитело к C5a.

NOX-D21 (Noxhon) представляет собой пегилированный смешанный L-РНК/ДНК-аптамер (Spiegelmer™) с последовательностью 40 кДа-ПЭГ-аминогексил-GCG AUG (dU)GG UGG UGA AGG GUU GUU GGG (dU)GU CGA CGC A(dC)G C (SEQ ID NO: 34). NOX-D21 нацелен на C5a (Huzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Beylier T, Ruegg UT, Vater A, and Takeda S. 2017. Low-Intensity Training and the C5a Complement

Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. Am. J. Pathol., 187(5):1147-1161; опубликовано в электронном виде до печати: March 18, 2017).

Экулизумаб (альтернативные названия: Солирис (Soliris™), 5G1-1; h5G1.1; Alexion Pharmaceuticals) представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное IgG2/4к-антитело, продуцируемое мышинной миеломной клеточной культурой и очищенное по стандартной технологии биопроцесса. Экулизумаб специфически связывается с C5 человека. Экулизумаб содержит человеческие константные области из последовательностей человеческого IgG2 и последовательностей человеческого IgG4 и мышинные участки, определяющие комплементарность, трансплантированные в человеческие переменные каркасные участки легкой и тяжелой цепей. Экулизумаб состоит из двух 448 аминокислотных тяжелых цепей и двух 214 аминокислотных легких цепей и его молекулярная масса приблизительно составляет 148 кДа. Тяжелая цепь и легкая цепь экулизумаба раскрыты, например, в WO 2016/061066 A1 как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 34, соответственно. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют тяжелые и легкие цепи экулизумаба, раскрыты, например, в патенте США No. 6,355,245.

ALXN1210 (альтернативное название: BNJ441; Alexion Pharmaceuticals) представляет собой антитело против C5. Тяжелые и легкие цепи ALXN1210 раскрыты в WO 2016/209956 A1 как SEQ ID NOs: 14 и 11, соответственно.

ALXN5500 (Алексион) представляет собой гуманизированное антитело против C5. Это кандидат в следующее поколение Экулизумаба.

LFG316 (альтернативное название: Тесидолумаб (Tesidolumab), NOV-4; Морфосис (Morphosys), Новартис (Novartis)) представляет собой антитело против C5.

Коверсин (Coversin™) (альтернативное название: EV 576; PAS-коверсин (PAS-coversin); rEV 576; Коверсин целевой ткани (Tissue targeted Coversin™) - Akari; Akari Therapeutics, Evlutec) представляет собой молекулу рекомбинантного белка (16,7 кДа), полученную из молекулы слюны из клеща *Ornithodoros moubata*, причем указанный белок помогает паразиту питаться, не вызывая иммунный ответ хозяина. Аминокислотная последовательность белка EV576 (то есть Коверсина), а также его кодирующая нуклеотидная последовательность показаны на Фиг.2 WO 2008/029167. Коверсин (Coversin™) связывается с C5.

RA101495 (Ra Pharma) представляет собой макроциклический синтетический пептидный ингибитор C5 (Ricardo A, Arata M, DeMarco S, Dhamnaskar K, Hammer R, Fridkis-Hareli M, Rajagopal V, Seyb K, Tang G-Q, Tobe S and Treco D. 2015. Preclinical Evaluation of RA101495, a Potent Cyclic Peptide Inhibitor of C5 for the Treatment of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Blood 126:939).

Зимура (Zimura®) (альтернативные названия: аптамер к C5; ARC-187; ARC-1905; Авацинкаптад пегол натрия; OphthoTech Corporation, Archemix Corporation) является пегилированным РНК-аптамером, который ингибирует фактор комплемента C5. Нуклеотидная последовательность ARC1905 (т.е.Зимуры) показана, например, в WO 2005/079363 A2 как SEQ ID NO: 67, а ее структура показана на Фиг. 22 WO 2005/079363 A2.

AMY-201 (Amyndas Pharmaceuticals) представляет собой модифицированную форму фактора Н, которая напрямую связывает регуляторные и распознающие поверхность домены; таким образом, это своего рода молекула мини-FH.

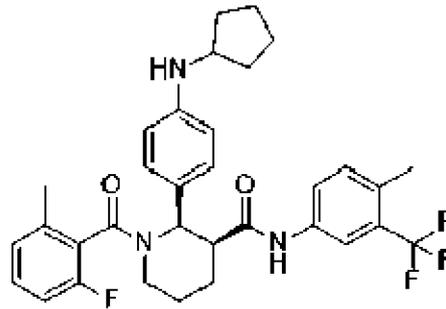
10 Mirocosept (альтернативные названия: APT070 и APT 070C; создатель: Adprotech; разработчик: Inflazyme Pharmaceuticals) состоит из первых трех коротких консенсусных доменов человеческого рецептора комплемента 1, изготовленных в рекомбинантных бактериях и модифицированных нацеленным на мембрану амфифильным пептидом на основе встречающегося в природе мембраносвязанного миристоил-электростатического переключающего пептида (Souza DG, Esser D, Bradford R, Vieira AT, and Teixeira MM. 2005. APT070 (Mirocosept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. Br J Pharmacol 145(8):1027-1034).

20 БикациоМаб (BikacioMab) (Novelmed) представляет собой фрагмент F(ab)2 антитела к фактору Bb, называемый NM001. Антитело NM001 продуцируется гибридной клеточной линией 1D3 депонированной под учетным номером ATCC PTA-8543.

25 Лампализумаб (Lampalizumab) (альтернативные названия: анти-фактор D Fab; FCFD4514S; RG7417; TNX-234; создатель: Tanox, разработчик: Genentech) представляет собой гуманизированный фрагмент Fab анти-фактора D, который ингибирует фактор D и альтернативный путь комплемента посредством связывания с экзозитом фактора D.

ALN-CC5 (Алнилам) (Alnylam) представляет собой RNAi-терапевтическое средство, нацеленное на C5 человека, приматов и грызунов. Типичные композиции iRNA, нацеленные на ген C5, описаны в WO 2016/044419.

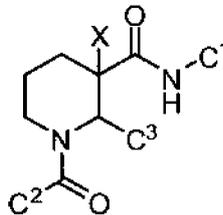
30 Авакопан (Авасоран) (также известный под названием CCX168; Chemocentryx) представляет собой небольшую молекулу (MW = 581,66 г/моль), имеющую структуру согласно Формуле I:



I

ИУРАС/ Химическое название авакопана (2R,3S)-2-[4-(циклопентиламино)фенил]-
 1-(2-фтор-6-метилбензоил)-N-[4-метил-3-(трифторметил)фенил]пиперидин-3-карбоновая
 5 кислота. Авакопан является селективным ингибитором C5aR. В контексте настоящего
 изобретения термин «авакопан» относится к соединению согласно Формуле I, а также к
 его физиологически переносимым солям.

Соединения, подобные авакопану, которые также подходят для практического
 осуществления настоящего изобретения, раскрыты в международных патентных заявках
 10 WO 2010/075257 A1 и WO 2011/163640 A1, содержание которых полностью включено в
 настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах
 реализации ингибитор активности C5a представляет собой соединение, имеющее
 Формулу II,



II

15 и его фармацевтически приемлемые соли, гидраты и ротомеры; где
 C1 выбран из группы, состоящей из арила и гетероарила, где гетероарильная группа
 содержит в качестве членов кольца от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O и S;
 и где указанные арильная и гетероарильная группы необязательно замещены 1-3
 20 заместителями R1;
 C2 выбран из группы, состоящей из арила и гетероарила, где гетероарильная группа
 содержит в качестве членов кольца от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O и S;
 и где указанные арильная и гетероарильная группы необязательно замещены 1-3
 заместителями R2;
 25 C3 выбран из группы, состоящей из C1-8 алкила или гетероалкила, C3-8 циклоалкила, C3-
 8 циклоалкил-C1-4 алкила, арила, арил-C1-4 алкила, гетероарила, гетероарил-C1-4

алкила, гетероциклоалкила или гетероциклоалкил-С1-4 алкила, где гетероциклоалкильная группа или часть содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O и S, и где гетероарильная группа содержит в качестве членов кольца от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O и S, и каждый С3 необязательно
5 замещен 1-3 заместителями R3;

каждый R1 независимо выбран из группы, состоящей из галогена, -CN, -Rc, -CO₂Ra, -CONRaRb, -C(O)Ra, -OC(O)NRaRb, -NRbC(O)Ra, -NRbC(O)₂Rc, -NRa-C(O)NRaRb, -NRaC(O)NRaRb, -NRaRb, -ORa и -S(O)₂NRaRb; где каждый Ra и Rb независимо
10 выбраны из водорода, С1-8 алкила и С1-8 галогеналкила, или, если они присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с указанным атомом азота с образованием пяти- или шестичленного кольца, содержащего в качестве членов кольца от 0 до 2 дополнительных гетероатомов, выбранных из N, O или S, и необязательно замещены одним или двумя оксо;
15 каждый Rc независимо выбран из группы, состоящей из С1-8 алкила или гетероалкила, С1-8 галогеналкила, С3-6 циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила, и где алифатические и циклические части Ra, Rb и Rc необязательно дополнительно замещены одной-тремя галогено-, гидрокси-, метильными, амино-, алкиламино- и диалкиламиногруппами; и, необязательно, если два заместителя R1
20 находятся у соседних атомов, они объединены с образованием конденсированного пяти- или шестичленного карбоциклического или гетероциклического кольца;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из галогена, -CN, -NO₂, -Rf, -CO₂Rd, -CONRdRe, -C(O)Rd, -OC(O)NRdRe, -NReC(O)Rd, -NReC(O)₂Rf, -NRdC(O)NRdRe, -NRdC(O)NRdRe, -NRdRe, -ORd и -S(O)₂NRdRe; где каждый Rd и
25 Re независимо выбраны из водорода, С1-8 алкила и С1-8 галогеналкила, или, если они присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с указанным атомом азота с образованием пяти- или шестичленного кольца, содержащего в качестве членов кольца от 0 до 2 дополнительных гетероатомов, выбранных из N, O или S, и необязательно замещены одним или двумя оксо;
30 каждый R независимо выбран из группы, состоящей из С1-8 алкила или гетероалкила, С1-8 галогеналкила, С3-6 циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила, и где алифатические и циклические части Rd, Re и Rf необязательно дополнительно замещены одной-тремя галогено-, гидрокси-, метильными, амино-, алкиламино- и диалкиламиногруппами, и, необязательно, если две группы R2
35 находятся у соседних атомов, они объединены с образованием пяти- или шестичленного кольца;

каждый R3 независимо выбран из группы, состоящей из галогена, -CN, -Ri, -CO2Rg, -CONRgRh, -C(O)Rg, -C(O)Ri, -OC(O)NRgRh, -NRhC(O)Rg, -NRhCO2Ri, -NRgC(O)NRgRh, -NRgRh, -ORg, -ORj, -S(O)2NRgRh, -X4-Rj, -NH-X4-Rj, -O-X4-Rj, -X4-NRgRh, -X4-NHRj, -X4-CONRgRh, -X4-NRhC(O)Rg, -X4-CO2Rg, -O-X4-CO2Rg, -NH-X4-CO2Rg, -X4-NRhCO2Ri, -O-X4-NRhCO2Ri, -NHRj и -NHCH2Rj, где X4 представляет собой C1-4 алкилен; каждый Rg и Rh независимо выбраны из водорода, C1-8 алкила или гетероалкила, C3-6 циклоалкила и C1-8 галогеналкила, или, если они присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с указанным атомом азота с образованием четырех-, пяти- или шестичленного кольца, содержащего в качестве членов кольца от 0 до 2 дополнительных гетероатомов, выбранных из N, O или S, и необязательно замещены одним или двумя оксо; каждый Ri независимо выбран из группы, состоящей из C1-8 алкила или гетероалкила, C1-8 галогеналкила, C3-6 циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила; и каждый Rj выбран из группы, состоящей из C3-6 циклоалкила, имидазолила, пиримидинила, пирролинила, пиперидинила, морфолинила, тетрагидрофуранила, тетрагидропиранила и S,S-диоксотетрагидротиопиранила, и где алифатические и циклические части Rg, Rh, Ri и Rj необязательно дополнительно замещены одной-тремя галогено, метильными, CF3, гидроксидными, C1-4 алкокси, C1-4 алкокси-C1-4 алкильными, -C(O)O-C1-8 алкильными, аминами, алкиламинами и диалкиламиногруппами, и, необязательно, когда две группы R3 находятся у соседних атомов, они объединены с образованием пяти- или шестичленного кольца; и

X представляет собой водород или CH3.

Соединения, подобные авакопану, но имеющие улучшенный профиль растворимости, раскрыты в WO 2017/176620 A2, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых других вариантах реализации ингибитор активности C5a представляет собой соединение следующей Формулы III:

каждый R_x независимо выбран из группы, состоящей из галогена, C1-6 алкила, C1-6 галогеналкила, C1-6 гетероалкила, CN, NR_yR_z, SR_y и OR_y;

каждый R_c независимо выбран из группы, состоящей из галогена, C1-6 алкила, C1-6 галогеналкила, C1-6 гетероалкила, CN, NR_yR_z, SR_y и OR_y;

5 каждый R_a, R_b, R_d, R_e, R_f, R_g, R_k, R_l, R_y и R_z независимо выбран из группы, состоящей из H и C1-6 алкила;

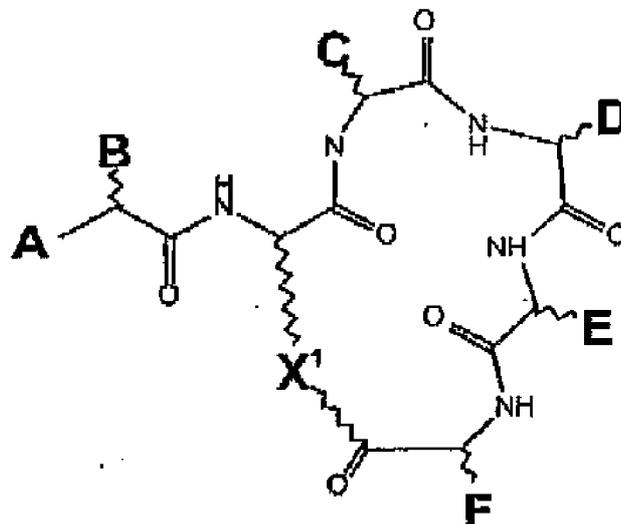
каждый R_h независимо выбран из группы, состоящей из H и C1-6 алкила, где C1-6 алкил необязательно замещен 1-5 заместителями, независимо выбранными из CO₂H, NR_iR_j, C6-10 арила, C3-10 циклоалкила, C5-10 гетероарила и C5-10 гетероциклила,

10 где каждый R_i и R_j независимо представляет собой H или C1-6 алкил;

где два из R₁, R₂ и R₃ представляют собой H, и один из R₁, R₂ и R₃ является отличным от H.

PMX-53 является эффективным антагонистом C5aR (CD88). Он представляет собой кольцевой пептид, состоящий из шести аминокислот, имеющий следующую последовательность: Ac-Phe-cyclo(Orn-Pro-D-Cha-Trp-Arg) с лактамным мостиком между Orn-2 и Arg-6. Поскольку PMX-53 содержит по меньшей мере одну D-аминокислоту (то есть D-Cha), он не включен в прилагаемый перечень последовательностей данной заявки. PMX-53 коммерчески доступен от Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Германия), номер по каталогу 5473.

20 Соединения, подобные PMX-53, которые также подходят для практического осуществления настоящего изобретения, раскрыты в международных патентных заявках WO 99/00406 A1, WO 03/033528 A1 и WO 2008/009062 A1, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах реализации ингибитор активности C5a представляет собой
25 циклический пептид или пептидомиметическое соединение Формулы IV



IV

где А представляет собой Н, алкил, арил, NH₂, NH-алкил, N(алкил)₂, NH-арил, NH-ацил, NH-бензоил, NHSO₃, NHSO₂-алкил, NHSO₂-арил, OH, O-алкил или O-арил;

В представляет собой алкильную, арильную, фенильную, бензильную, нафтильную или индольную группу, или боковую цепь D- или L-аминокислоты, но не является боковой цепью глицина, D-фенилаланина, L-гомофенилаланина, L-триптофана, L-гомотриптофана, L-тирозина или L-гомотироина;

С представляет собой боковую цепь D-, L- или гомоаминокислоты, но не является боковой цепью изолейцина, фенилаланина или циклогексилаланина;

10 D представляет собой боковую цепь нейтральной D-аминокислоты, но не является боковой цепью глицина или D-аланина, объемной плоской боковой цепью или объемной заряженной боковой цепью;

Е представляет собой объемный заместитель, но не является боковой цепью D-триптофана, L-N-метилтриптофана, L-гомофенилаланина, L-2-нафтил-L-тетрагидроизохинолина, L-циклогексилаланина, D-лейцина, L-флуоренилаланина или L-гистидина;

15 F представляет собой боковую цепь L-аргинина, L-гомоаргинина, L-цитруллина или L-канаванина, или их биоизостеров; и

X1 представляет собой -(CH₂)_nNH- или (CH₂)_nS-, где n представляет собой целое число от 1 до 4; -(CH₂)₂O-; -(CH₂)₃O-; -(CH₂)₃-; -(CH₂)₄-, -CH₂-COCHRNH- или -CH₂-CHCOCHRNH-, где R представляет собой боковую цепь любой стандартной или нестандартной аминокислоты.

В этом контексте термин «стандартная аминокислота» относится к двадцати протеиногенным аминокислотам, которые определены стандартным генетическим кодом.

25 Термин «нестандартная аминокислота» включает, но не ограничивается ими, D-аминокислоты, гомоаминокислоты, N-алкиламинокислоты, дегидроаминокислоты, ароматические аминокислоты, отличные от фенилаланина, тироина и триптофана, орто-, мета- или парааминобензойную кислоту, орнитин, цитруллин, канаванин, норлейцин, δ-глутаминовую кислоту, аминокислотную кислоту, L-флуоренилаланин, L-3-бензотиенилаланин и α,α-дизамещенные аминокислоты.

30 Специфические антагонисты C5aR (CD88), подходящие для практического осуществления настоящего изобретения, включают PMX95, PMX218, PMX200, PMX273, PMX205 и PMX201, раскрытые в WO 2008/009062 A1.

Клон S5/1 представляет собой моноклональное антитело, распознающее человеческий рецептор C5a (CD88). Клон S5/1 был получен против синтетического

пептида, содержащего N-концевой домен C5aR (Met1-Asn31). Было показано, что указанное антитело ингибирует связывание C5a с его рецептором. Оно коммерчески доступно от Nycult Biotech (Uden, The Нидерланды), номер по каталогу HM2094.

5 Клон 7H110 представляет собой моноклональное антитело мыши, распознающее человеческий рецептор C5a (CD88). Он коммерчески доступен от Biomol GmbH (Hamburg, Германия); номер по каталогу C2439-60N.

10 Термин «пациент» в настоящем описании означает любое млекопитающее или птицу, на которых может оказать благоприятное действие лечение соединением, описанным в настоящей заявке (т.е. ингибитором активности C5a, описанным в настоящей заявке). Предпочтительно «пациент» выбран из группы, состоящей из лабораторных животных (например, мыши или крысы), домашних животных (включая, например, морскую свинку, кролика, курицу, индейку, свинью, овцу, козу, верблюда, корову, лошадь, осла, кошку или собаку), или приматов, включая шимпанзе и людей. Особенно предпочтительно «пациент» представляет собой человека.

15 Термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» заболевания или расстройства в настоящем описании означают выполнение одного или более из следующего: (a) снижение тяжести и/или продолжительности расстройства; (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характеризующих излечиваемое расстройство(a); (c) ингибирование ухудшения симптомов, характеризующих излечиваемое расстройство(a); (d) ограничение или предотвращение рецидива расстройств(a) у пациентов, которые ранее имели расстройство(a); и (e) ограничение или предотвращение рецидива симптомов у пациентов, которые ранее имели симптомы расстройств(a).

25 Термины «предотвращать», «осуществление предотвращения», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или расстройства в настоящем описании означают предотвращение возникновения расстройства у субъекта.

30 «Эффективное количество» представляет собой количество терапевтического агента, достаточное для достижения намеченной цели. Эффективное количество данного терапевтического агента будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как природа агента, путь введения, размер и вид животного для получения терапевтического агента и цель введения. Эффективное количество в каждом отдельном случае может быть определено эмпирически опытным специалистом в соответствии с установленными в данной области способами.

35 «Фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или внесенный в список

Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на животных, и в частности на людях.

Варианты реализации изобретения

5 Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано. В следующих утверждениях различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный ниже, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или выгодные.

10 Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности С5а для применения при лечении медицинского состояния, вызванного или ассоциированного с инфекцией коронавирусом, причем указанное медицинское состояние предпочтительно представляет собой (i) пневмонию и/или (ii) лихорадку.

15 Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности С5а для применения при уменьшении воспалительного ответа у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

20 Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к ингибитору активности С5а для применения при улучшении функции органов, в частности, функции легких и/или функции печени, у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

 Ингибитор активности С5а для применения по любому из пп. 1-3, характеризующийся тем, что указанный коронавирус выбран из группы, включающей SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.

25 Коронавирус представляет собой: тип распространенного вируса, который инфицирует людей, обычно приводя к инфекции верхних дыхательных путей (URI). Выявлено семь различных типов коронавируса человека. Большинство людей будут инфицированы по меньшей мере одним типом коронавируса в течение своей жизни. Вирусы распространяются по воздуху при кашле и чихании, тесном личном контакте, прикосновении к предмету или поверхности, загрязненной вирусом, и редко при
30 загрязнении фекалиями. Болезнь, вызванная большинством коронавирусов, обычно длится короткое время и характеризуется насморком, болью в горле, чувством плохого самочувствия, кашлем и лихорадкой.

 Неограничивающие примеры коронавирусов человека, которые, как сообщалось, вызывают тяжелые симптомы, включают MERS-CoV (бета-коронавирус, который
35 вызывает ближневосточный респираторный синдром, или MERS), SARS-CoV (бета-

коронавирус, который вызывает тяжелый острый респираторный синдром, или SARS) и новую вспышку нового коронавируса 2019 (2019-nCoV), которая началась в Ухане, Китай.

Согласно предпочтительному варианту реализации от первого до третьего аспектов настоящего изобретения субъект страдает SARS, MERS или COVID-19, в частности, COVID-19.

Согласно предпочтительному варианту реализации от первого до третьего аспектов настоящего изобретения лечение приводит к одному или более из следующего:

- уменьшению уровня С-реактивного белка;
- уменьшению лихорадки;
- 10 - увеличению количества лимфоцитов в крови;
- уменьшению уровня АЛТ/АСТ; и/или
- увеличению кислородного индекса (PaO₂/FiO₂).

С-реактивный белок обычно находится в диапазоне 0-5 мг/л у здоровых людей. Пациенты с коронавирусной инфекцией (например, COVID-19) имеют приблизительно 50 мг/л (см. Chen et al. The Lancet 2020 [oi.org/10.1016/S0140-6736](https://doi.org/10.1016/S0140-6736)). Таким образом, уменьшение уровня С-реактивного белка достигается, если он уменьшается до менее 40 мг/л, предпочтительно до менее 30 мг/л, более предпочтительно до менее 10 мг/л, более предпочтительно до менее 5 мг/л.

Количество лимфоцитов в крови обычно находится в диапазоне от 1,1 до 3,2x10⁹/л у здоровых людей. Значения у пациентов с легкой коронавирусной инфекцией (например, COVID-19) находятся в диапазоне 0,6-1,2x10⁹/л с медианой 0,9x10⁹/л, в то время как более тяжелая (например, COVID-19) инфекция приводит к диапазону 0,5-0,9x10⁹/л с медианой 0,8x10⁹/л (см. Wang et al. JAMA [doi:10.1001/jama.2020.1585](https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585)). Таким образом, увеличение количества лимфоцитов в крови достигается, если количество лимфоцитов у соответствующего пациента увеличивается по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 100%. В абсолютном выражении ингибитор С5а для применения согласно настоящему изобретению увеличивает количество лимфоцитов у пациента по меньшей мере до 1,0x10⁹/л, более предпочтительно по меньшей мере 1,3x10⁹/л.

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) обычно находится в диапазоне 9-50 Ед./л у здоровых людей. Значения у пациентов с легкой коронавирусной инфекцией (например, COVID-19) находятся в диапазоне 15-36 Ед./л с медианой 23 Ед./л, в то время как более тяжелая (например, COVID-19) инфекция приводит к диапазону 19-57 Ед./л с медианой 35 Ед./л (см. Wang et al. JAMA [doi:10.1001/jama.2020.1585](https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585)). Таким образом, уменьшение АЛТ достигается, если АЛТ у соответствующего пациента уменьшается по меньшей мере на

20%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 100%.

Аспартатаминотрансфераза (АСТ) обычно находится в диапазоне 15-40 Ед./л у здоровых людей. Значения у пациентов с легкой коронавирусной инфекцией (например, COVID-19) находятся в диапазоне 21-38 Ед./л с медианой 29 Ед./л, в то время как более тяжелая (например, COVID-19) инфекция приводит к диапазону 30-70 Ед./л с медианой 52 Ед./л (см. Wang et al. JAMA doi:10.1001/jama.2020.1585). Таким образом, уменьшение АСТ достигается, если АСТ у соответствующего пациента уменьшается по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 100%.

Кислородный индекс PaO_2/FiO_2 у здорового пациента находится в диапазоне 400-500 мм рт. ст. Значения у пациентов с коронавирусной инфекцией (например, COVID-19) находятся в диапазоне 103-234 мм рт. ст. с медианой 136 мм рт. ст. Таким образом, увеличение кислородного индекса PaO_2/FiO_2 достигается, если кислородный индекс PaO_2/FiO_2 у соответствующего пациента увеличивается по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 100%. В абсолютном выражении ингибитор С5а для применения согласно настоящему изобретению увеличивает кислородный индекс PaO_2/FiO_2 пациента по меньшей мере до 250 мм рт. ст., более предпочтительно по меньшей мере 300 мм рт. ст.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности С5а:

- снижает концентрацию С5 (например, путем ингибирования образования и/или активности С3-конвертазы; путем ингибирования образования и/или активности С5-конвертазы; путем ингибирования транскрипции гена С5; путем блокирования трансляции мРНК С5; путем увеличения деградации мРНК С5, путем увеличения деградации белка С5 или путем предотвращения секреции С5 из печени);
- ингибирует расщепление С5 на С5а и С5b (например, путем ингибирования С5-конвертазы или связывания с сайтом расщепления на С5, тем самым блокируя расщепление);
- снижает концентрацию С5а (например, путем увеличения деградации белка С5а);
- ингибирует связывание между С5а и рецептором С5а (например, путем связывания с С5а или связывания с рецептором С5а);
- снижает концентрацию рецептора С5а (например, путем ингибирования транскрипции гена рецептора С5а; путем блокирования трансляции мРНК рецептора С5а; путем

увеличения деградации мРНК рецептора C5a; путем увеличения деградации белка рецептора C5a); и/или

- снижает активность рецептора C5a.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из белкового лиганда (как определено выше); олигонуклеотида и небольшой молекулы (как определено выше). Олигонуклеотиды, действующие в качестве ингибиторов активности C5a, могут достигать своего ингибирующего эффекта, например, связываясь с молекулами нуклеиновой кислоты (таким образом, ингибируя транскрипцию и/или трансляцию) или связываясь с белками (например, когда олигонуклеотиды являются аптамерами нуклеиновых кислот).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд, который специфически связывается с белком C5, или с белком C5a, или с белком рецептора C5a. В дополнительных вариантах реализации белковый лиганд выбран из группы, состоящей из

- (i) антител (например, анти-C5-антител, анти-C5a-антител, анти-C5aR-антител или анти-C5L2-антител),
- (ii) антигенсвязывающих фрагментов антител,
- (iii) антителоподобных белков,
- (iv) ингибирующих вариантов C5a,
- (v) ингибирующих вариантов рецептора C5a (например, рецепторы-ловушки),
- (vi) белков, действующих на путь комплемента (например, Коверсин); и
- (vii) пептидов (например, RA101495 (Ra Pharma, Кембридж, MA); PMX-53 (Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Германия)).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, который специфично связывается с конформационным эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями NDETCEQRA (SEQ ID NO:2) и SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) C5a человека. Связывание с конформацией, образованной аминокислотными последовательностями в соответствии с SEQ ID NO: 2 и 3, означает, что белковый лиганд или олигонуклеотид связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 2 соответствует аминокислотам 30-38 C5a человека. SEQ ID NO: 3 соответствует аминокислотам 66-72 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с DETCEQR (SEQ ID NO: 4). SEQ ID NO: 4 соответствует аминокислотам 31-37 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно НКДМQ (SEQ ID NO:5), более предпочтительно по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности KDM. SEQ ID NO: 5 соответствует аминокислотам 67-71 C5a человека; последовательность KDM соответствует аминокислотам 68-70 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности DETCEQR (SEQ ID NO:4) и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности НКДМQ (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности DETCEQR (SEQ ID NO:4) и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности KDM.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения две последовательности, образующие конформационный эпитоп C5a (например, пары последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 4 и 5; или SEQ ID NO: 4 и последовательность KDM), разделены 1-50 смежными аминокислотами, которые не участвуют в связывании со связывающей группой согласно настоящему изобретению. Далее такие аминокислоты, которые не участвуют в связывании со связывающей группой согласно настоящему изобретению, будут называться «несвязывающими аминокислотами». Две последовательности, образующие конформационный эпитоп, предпочтительно разделены 6-45 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 12-40 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 18-35 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 24-30 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 25-29 смежными несвязывающими аминокислотами, еще более

предпочтительно 26-28 смежными несвязывающими аминокислотами и наиболее предпочтительно 27 смежными несвязывающими аминокислотами.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, специфично связывающийся с конформационным эпитопом C5a, обладает константой связывания (Kd) с C5a человека, значение которой составляет 10 нМ или менее, предпочтительно 9 нМ или менее, более предпочтительно 8 нМ или менее, более предпочтительно 7 нМ или менее, более предпочтительно 6 нМ или менее, более предпочтительно 5 нМ или менее, более предпочтительно 4 нМ или менее, более предпочтительно 3 нМ или менее, более предпочтительно 2 нМ или менее и еще более предпочтительно 1 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения константа диссоциации Kd между связывающей группой и C5a человека составляет от 1 пМ (пикомолярная) до 5 нМ (наномолярная), более предпочтительно от 2 пМ до 4 нМ, более предпочтительно от 5 пМ до 3 нМ, более предпочтительно от 10 пМ до 2 нМ, более предпочтительно от 50 пМ до 1 нМ, более предпочтительно от 100 пМ до 900 пМ, более предпочтительно от 200 пМ до 800 пМ, более предпочтительно от 300 пМ до 700 пМ, и еще более предпочтительно от 400 пМ до 600 пМ.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, специфично связывающийся с C5a, проявляет по меньшей мере 75% блокирующую активность, предпочтительно по меньшей мере 80% блокирующую активность, более предпочтительно по меньшей мере 85% блокирующую активность, более предпочтительно по меньшей мере 90% блокирующую активность, более предпочтительно по меньшей мере 95% блокирующую активность для биологических эффектов, индуцируемых одной молекулой C5a, в частности, C5a человека. Эти конкретные виды блокирующей активности относятся к тем вариантам реализации, в которых связывающая группа содержит единственный паратоп, связывающийся с C5a, предпочтительно с C5a человека. В вариантах реализации, где связывающая группа содержит два или более C5a-специфических паратопов, указанные блокирующие активности по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85% и т.д., достигаются, когда контактирует одна молекула связывающей группы с числом молекул C5a, равным количеству C5a-специфических паратопов, присутствующих в связывающей группе. Другими словами, когда паратопы связывающей группы, описанной в настоящей заявке, и C5a присутствуют в эквимольных концентрациях, связывающая группа проявляет блокирующую

активность по меньшей мере приблизительно 75%, предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере приблизительно 85%, более предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере приблизительно 95% для биологических эффектов, индуцируемых C5a. Предпочтительным биологическим эффектом, подлежащим блокированию, является индуцированное C5a высвобождение лизоцима из клеток цельной крови человека. Анализы для определения этого C5a-индуцированного высвобождения лизоцима и его блокирования описаны, например, в WO 2011/063980 A1 и в соответствующей национальной заявке США US 2012/0231008 A1.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

- (i) последовательность CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6; или
 - (ii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7;
- при этом последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

- (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8; или
 - (iv) последовательность CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9;
- при этом последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

- (i) последовательность CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8; или
- (ii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9;

при этом указанная последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно содержит 1, 2 или 3 замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены аминокислот, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 вставки аминокислот; и

5 при этом указанная последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей
10 мере одну из следующих последовательностей:

- (v) последовательность CDR2 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 10;
- (vi) последовательность CDR2 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 11;
- (vii) последовательность CDR2 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 12;
- (viii) последовательность CDR2 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 13;
- 15 (ix) последовательность CDR1 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 14;
- (x) последовательность CDR1 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 15;
- (xi) последовательность CDR1 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 16; или
- (xii) последовательность CDR1 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 17;

при этом указанная последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно содержит 1, 2
20 или 3 замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены аминокислот, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 вставки аминокислот;

при этом последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

25 при этом последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

при этом последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2
30 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В конкретных вариантах реализации общее количество этих необязательных изменений указано выше в каждой из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, и SEQ ID

NO: 17, т.е. общее количество замен, делеций и добавлений в каждой последовательности составляет 1 или 2.

В конкретных вариантах реализации общее количество замен, делеций и добавлений, добавленных для всех CDR, присутствующих в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, составляет от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий один из наборов А-Н последовательностей CDR3 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR1 тяжелой цепи, которые перечислены ниже в Таблице 1, при этом каждая последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; при этом каждая последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и при этом каждая последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот:

Таблица 1: Наборы последовательностей CDR тяжелой цепи, подходящих для применения в антителах или их фрагментах в настоящем изобретении

Символ набора тяжелой цепи	Последовательность CDR3	Последовательность CDR2	Последовательность CDR1
A	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
B	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
C	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
D	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15
E	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
F	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
G	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
H	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий один из следующих наборов I-IV последовательностей CDR3 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR1 легкой цепи, которые перечислены в Таблице 2,

- 5 при этом каждая последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;
- при этом каждая последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и
- 10 при этом каждая последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

15 **Таблица 2: Наборы последовательностей CDR легкой цепи, подходящих для применения в антителах или их фрагментах согласно настоящему изобретению**

Поскольку последовательность CDR2 легкой цепи антитела IFX-1 (SEQ ID NO:12) идентична последовательности CDR2 легкой цепи антитела INab708 (SEQ ID NO: 13), наборы, включающие SEQ ID NO: 13, будут избыточными для наборов, включающих SEQ ID NO: 12. Таким образом, в таблице только четыре набора последовательностей CDR легкой цепи.

Номер набора легкой цепи	Последовательность CDR3	Последовательность CDR2	Последовательность CDR1
I	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
II	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17
III	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
IV	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий один из наборов A-H CDR тяжелой цепи, перечисленных выше в Таблице 1, и один из наборов I-IV CDR легкой цепи, перечисленных выше в Таблице 2, то есть в одной из следующих комбинаций наборов: A-I, A-II, A-III, A-IV, B-I, B-II, B-III, B-IV, C-I, C-II, C-III, C-IV, D-I, D-II, D-III, D-IV, E-I, E-II, E-III, E-IV, F-I, F-II, F-III, F-IV, G-I, G-II,

G-III, G-IV, H-I, H-II, H-III или H-IV (причем комбинации A-I и H-IV являются особенно предпочтительными),

причем каждая последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1,

5 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом каждая последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

10 при этом каждая последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

причем каждая последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

15 причем каждая последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

20 причем каждая последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VH, который содержит, по существу состоит из или состоит из (i) домена VH IFX-1 или (ii) домена VH INab708.

25 Последовательности FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, определяющие домены VH IFX-1 и INab708, показаны ниже в Таблице 3.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VL, который содержит, по существу состоит из или состоит из (i)

30 домена VL IFX-1 или (ii) домена VL INab708. Последовательности FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, определяющие домены VL IFX-1 и INab708, показаны ниже в Таблице 3.

Таблица 3: Последовательности CDR и FR антител IFX-1 и INab708 (классификация в соответствии с системой Chothia)

IFX-1:	INab708:
<u>Тяжелая цепь:</u>	<u>Тяжелая цепь:</u>
FR1: QVQLQQSGPQLVRPGTSVKIS (= SEQ ID NO: 18)	FR1: VQLLESGAELMKPGASVKIS (SEQ ID NO: 26)
CDR1: CKASGYSFTTFWMD (= SEQ ID NO: 14)	CDR1: CKATGNTFSGYWIE (= SEQ ID NO: 15)
FR2: WVKQRPGQGLEWIGR (SEQ ID NO: 19)	FR2: WVKQRPGHGLEWIGE (SEQ ID NO: 27)
CDR2: IDPSDSESRLDQ (= SEQ ID NO: 10)	CDR2: ILPGSGSTNYNE (= SEQ ID NO: 11)
FR3: RFKDRATLTVDKSSSTVYMQLSSTSEDS AVYY (SEQ ID NO: 20)	FR3: KFKGKATLTADTSSNTAYMQLSSTSEDS AVYY (SEQ ID NO: 28)
CDR3: CARGNDGYGFAY (= SEQ ID NO: 6)	CDR3: CTRRGLYDGSSYFAY (= SEQ ID NO: 7)
FR4: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)	FR4: WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 29)
<u>Легкая цепь:</u>	<u>Легкая цепь:</u>
FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 22)	FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 30)
CDR1: CKASQSVDYDGDSYMK (= SEQ ID NO: 16)	CDR1: CKASQSVDYDGDSYMN (= SEQ ID NO: 17)
FR2: WYQQKPGQPPKLL (SEQ ID NO: 23)	FR2: WYQQKPGQPPKLL (SEQ ID NO: 31)
CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 12)	CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 13)
FR3: QSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAA TTY (SEQ ID NO: 24)	FR3: GSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEVAA TTY (SEQ ID NO: 32)
CDR3: CQQSNEDPYT (= SEQ ID NO: 8)	CDR3: CQQNNEDPLT (= SEQ ID NO: 9)
FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25)	FR4: FGAGTLLELK (SEQ ID NO: 33)

5 Согласно некоторым вариантам реализации антитело для применения в настоящем изобретении или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 34 и последовательность вариабельной области легкой цепи с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 35 или варианты, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93% или по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 34 и 35, которые содержат аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой и тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14 и 16 или их варианты, как указано выше;
- (ii) последовательность вариабельной области тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 и последовательность вариабельной области легкой цепи с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 37 или варианты, имеющие по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 36 и 37, которые содержат аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой и тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15 и 17 или их варианты, как указано выше.

В указанном выше аспекте CDR не имеют или имеют минимальные вариации, т.е. 1, 2 или 3 аминокислоты, как описано выше, и большинство аминокислотных модификаций находятся в каркасных участках.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, который специфично связывается с C5 или с C5a, или с рецептором C5a. В других вариантах реализации олигонуклеотид представляет собой аптамер нуклеиновой кислоты. Аптамер нуклеиновой кислоты может быть выбран из группы, состоящей из ДНК-аптамеров, D-РНК-аптамеров и L-РНК-аптамеров (например, Spiegelmers™).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a. В других вариантах реализации указанный ингибитор активности C5a, который снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a, представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из антисмысловой ДНК, антисмысловой РНК, миРНК и микроРНК.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения рецептор C5a представляет собой C5aR и/или C5L2. В предпочтительных вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения рецептором C5a является C5aR (также известен как CD88 или C5aR1).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из:

- (a) IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007, или NOX-D21, или их антигенсвязывающего фрагмента;
- 5 (b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (a), за связывание с C5a;
- (c) Экулизумаба, ALXN1210, ALXN5500, или LFG316, или их антигенсвязывающего фрагмента;
- 10 (d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (c), за связывание с C5;
- (e) Коверсина или RA101495;
- (f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка или макроциклического пептида, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или макроциклический пептид конкурирует с одним из белков или пептидов, указанными в
- 15 пункте (e), за связывание с C5;
- (g) Зимурь;
- (h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или аптамера, причем указанное
- 20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или аптамер конкурируют с зимурой за связывание с C5;
- (i) АМУ-201 или Мирокоцепта;
- (j) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или белок конкурируют с одним из
- 25 белков, указанных под (i), за связывание с C3b;
- (k) Бикациомаба;
- (l) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с бикациомабом за связывание с фактором В;
- 30 (m) Лампализумаба;
- (n) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с лампализумабом за связывание с фактором D;
- (o) ALN-CC5; и

- (p) Авакопана, или соединения согласно Формуле II или III, или РМХ-53, или соединения согласно Формуле IV;
- (q) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с авакопаном или РМХ-53 за связывание с C5aR;
- (r) клона S5/1 или клона 7H110, или их антигенсвязывающего фрагмента; и
- (s) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (r), за связывание с C5aR.

Фармацевтические композиции и способы введения

В практике осуществления любого аспекта настоящего изобретения соединение (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящей заявке) или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, можно вводить пациенту любым путем, установленным в данной области, который обеспечивает достаточный уровень соединения у больного. Его можно вводить системно или локально. Такое введение может быть парентеральным, трансмукозальным, например, пероральным, назальным, ректальным, интравагинальным, сублингвальным, подслизистым, трансдермальным или ингаляционным. Предпочтительно введение является парентеральным, например, посредством внутривенной или внутривенной инъекции, а также включает, но не ограничивается этим, внутриартериальное, внутримышечное, внутрисуставное и подкожное введение. Если соединение, описанное в настоящей заявке (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящей заявке), или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, вводят локально, его можно вводить непосредственно в орган или ткань, подлежащие лечению.

Фармацевтические композиции, адаптированные для перорального введения, могут быть представлены в виде капсул или таблеток; в виде порошков или гранул; в виде растворов, сиропов или суспензий (в водных или неводных жидкостях); в виде съедобных пен или взбитых смесей; или в виде эмульсий. Таблетки или твердые желатиновые капсулы могут содержать лактозу, крахмал или его производные, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния, стеариновую кислоту или их соли. Мягкие желатиновые капсулы могут содержать растительные масла, воски, жиры, полутвердые или жидкие полиолы и т.д. Растворы и сиропы могут содержать воду, полиолы и сахара.

Активный агент, предназначенный для перорального введения, может быть покрыт или смешан с материалом, который задерживает распад и/или абсорбцию активного

агента в желудочно-кишечном тракте (например, может использоваться глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат). Таким образом, замедленное высвобождение активного агента может быть достигнуто в течение многих часов, и, если необходимо, активный агент может быть защищен от разложения в желудке.

5 Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть составлены для облегчения высвобождения активного агента в особой части желудочно-кишечного тракта из-за специфического рН или ферментативных условий.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут быть предоставлены в виде отдельных пластырей, предназначенных для того, чтобы
10 оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения, могут быть представлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Для местного применения на кожу, рот, глаз или другие внешние ткани предпочтительно использовать мазь или крем. Если
15 приготовление представлено в виде мази, активный ингредиент можно использовать с парафиновой или с водорастворимой основой. Альтернативно, активный ингредиент может быть приготовлен в виде крема на основе «масло-в-воде» или на основе «вода-в-масле». Фармацевтические композиции, адаптированные для местного введения в глаз, включают глазные капли. В этих композициях активный ингредиент может быть
20 растворен или суспендирован в подходящем носителе, например в водном растворителе. Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения во рту, включают таблетки, пастилки и жидкости для полоскания рта.

Фармацевтические композиции, адаптированные для назального введения, могут содержать твердые носители, такие как порошки (предпочтительно с размером частиц,
25 составляющем диапазон от 20 до 500 микрон). Порошки могут быть введены способом, которым принимается нюхательный табак, то есть путем быстрого вдыхания через нос из контейнера с порошком, удерживаемого близко к носу. Альтернативно, композиции, принятые для назального введения, могут содержать жидкие носители, например, назальные спреи или назальные капли. Эти композиции могут содержать водные или
30 масляные растворы активного ингредиента. Композиции для введения путем ингаляции могут поставляться в специально приспособленных устройствах, включая, но не ограничиваясь этим, аэрозоли под давлением, небулайзеры или инсуффляторы, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы обеспечить заданные дозы активного ингредиента. Фармацевтические композиции могут также вводиться через носовую
35 полость в легкие.

Фармацевтические композиции, предназначенные для ректального введения, могут быть предоставлены в виде суппозиториев или клизм. Фармацевтические композиции, адаптированные для вагинального введения, могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев.

5 Фармацевтические композиции, адаптированные для парентерального введения, включают в себя водные и неводные стерильные инъекционные растворы или суспензии, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают композиции в значительной степени изотоническими с кровью предполагаемого реципиента. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких
10 композициях, включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Композиции, адаптированные для парентерального введения, могут быть представлены в контейнерах с однократными или многократными дозами, например, в запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в условиях сухой заморозки (лиофилизированных условиях), требующих только добавления стерильного жидкого
15 носителя, например, стерильного физиологического раствора для инъекций, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

В предпочтительном варианте реализации соединение, описанное в настоящей
20 заявке (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящей заявке), готовят в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может включать
25 солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в смешанном виде в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда
30 композицию следует вводить инфузией, можно использовать флакон для инфузии, содержащий стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Когда композицию вводят инъекцией, может быть предоставлена ампула стерильного физиологического раствора, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

В другом варианте реализации, например, соединение (например, ингибитор
35 активности C5a, описанный в настоящей заявке) или фармацевтическую композицию,

содержащую соединение, можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Например, соединение может быть введено с использованием внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте реализации может использоваться насос (см. 5 Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201; Buchwald et al. (1980) *Surgery* 88:507; Saudek et al. (1989) *N. Eng. J. Med.* 321: 574). В другом варианте реализации соединение может быть доставлено в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Treat et al. (1989) в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., 353-365; WO 91/04014; U.S. 4704355).

10 В другом варианте реализации могут быть использованы полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release* (1974) Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, (1984) Smolen and Ball (eds.), Wiley: N.Y.; Ranger and Peppas (1953) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; см. также Levy et al. (1985) *Science* 228:190; During et al. (1989) 15 *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* 71: 105).

В еще одном варианте реализации система контролируемого высвобождения может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, то есть целевых клеток, ткани или органа, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson (1984) 115-138 в *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2).

20 Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533).

В конкретном варианте реализации может быть желательным вводить соединение, описанное в настоящей заявке (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящей заявке), или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, 25 локально в область, нуждающуюся в лечении. Это может быть достигнуто, например, без ограничения, локальной инфузией во время операции, местным применением, например, в сочетании с повязкой на рану после операции, с помощью инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория, или с помощью имплантата, причем указанный имплантат выполнен из пористого, непористого или желатинового материала, включая мембраны, 30 такие как эластичные мембраны или волокна.

Выбор предпочтительной эффективной дозы будет определяться специалистом в данной области на основе рассмотрения нескольких факторов, которые будут известны специалисту в данной области. Такие факторы включают конкретную форму фармацевтической композиции, например, полипептид или вектор и его 35 фармакокинетические параметры, такие как биологическая доступность, метаболизм,

период полураспада и т. д., которые будут установлены в ходе обычных процедур разработки, обычно используемых при получении одобрения контролирующих органов для фармацевтического соединения. Дополнительные факторы при рассмотрении дозы включают состояние или заболевание, которое необходимо предотвратить и/или лечить, или благоприятное действие, которое необходимо достичь у нормального человека, массу тела пациента, способ введения, является ли введение острым или хроническим, сопутствующие лекарственные средства, и другие хорошо известные факторы, влияющие на эффективность вводимых фармацевтических агентов. Таким образом, точная дозировка должна определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента, например, в зависимости от состояния и иммунного статуса отдельного пациента, в соответствии со стандартными клиническими методиками.

Предпочтительная дозировка для ингибитора активности C5a согласно настоящему изобретению, в частности, для IFX-1, представляет собой дозировку от 200 мг до 500 мг в сутки, предпочтительно от 250 мг до 350 мг в сутки, более предпочтительно 300 мг в сутки. Дозировки предпочтительно вводят один раз в сутки, более предпочтительно в режиме дозирования, при котором вводят ингибитор активности C5a, в частности, IFX-1, в день 1, день 2, день 3, день 5, день 7, день 9, день 11 и день 13.

Предпочтительно ингибитор активности C5a, в частности, IFX-1, вводят путем парентерального применения, более предпочтительно внутривенного введения.

20

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Нуклеокапсидные белки SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV 2 связываются с MASP-2.

(А) Лизаты из клеток 293Т, трансфицированных GFP-N и GFP-вектором, подвергали иммунопреципитации с Flag-меченым полноразмерным (FL) MASP-2 или усеченными мутантами (CUB1-EGF-CUB2 и CCP1-CCP2-SP), конъюгированными с гранулами агарозы, в присутствии 2 мМ CaCl₂ или 1 мМ ЭДТА. Иммуноблоттинг выполняли с антителами к GFP и антителами к Flag. Инкубированные IgG-гранулы и Flag-гранулы использовали в качестве отрицательного контроля. (В) Лизаты из клеток 293Т, трансфицированных Flag-N или Flag-вектором, смешивали с сывороткой человека (HS) и сывороткой мыши (MS) и подвергали иммунопреципитации с использованием гранул агарозы против Flag. Адсорбаты зондировали антителами к Flag и антителами к MASP-2. Очищенный рекомбинантный MASP-2 загружали в качестве маркера. (С) Лизаты из

30

клеток 293Т, трансфицированных полноразмерным GFP-N и его мутантами Δ321-323 и Δ116-124, подвергали иммунопреципитации с MASP-2-Flag-конъюгированными гранулами агарозы в присутствии 2 мМ CaCl₂ и анализировали с помощью иммуноблоттинга с антителами к GFP и антителами к Flag. (D) Лизаты из клеток 293Т, экспрессирующих GFP-MERS-CoV N и его усеченный мутант Δ104-112, подвергали иммунопреципитации с MASP-2-Flag-конъюгированными гранулами агарозы в присутствии 2 мМ CaCl₂ и анализировали, как указано выше. (E) Лизаты из клеток 293Т, экспрессирующих HA-меченый N-белок SARS-CoV-2, подвергали иммунопреципитации с MASP-2-Flag-конъюгированными гранулами агарозы в присутствии 2 мМ CaCl₂, адсорбаты зондировали антителами к HA и антителами к Flag.

Фигура 2. Нуклеокапсидные белки индуцируют аутоактивацию MASP-2 и расщепление C4.

(A) Лизаты из клеток, экспрессирующих MASP-2-Мус, смешивали с очищенным N или MBL и подвергали иммунопреципитации с MASP-2-Flag-конъюгированными гранулами агарозы в присутствии 2 мМ CaCl₂. Иммуноблоттинг выполняли с использованием антитела к Мус. (B) Очищенный MASP-2-Flag инкубировали с N, MBL и маннаном или без них при 37°C в течение 12 часов. Расщепленный MASP-2 зондировали антителом к Flag. (C) Очищенные белки MASP-2 и N с/без моноклонального антитела к N инкубировали с предварительно конъюгированным MBL в планшетах, покрытых маннаном, при 4°C. Связывание MASP-2 детектировали с использованием антитела к MASP-2. *P<0,05 и **P<0,01 в сравнении с ЧСА согласно непарному двустороннему t-критерию Стьюдента. (D) C4 инкубировали с MASP-2, MBL, маннаном, N-белком и ЧСА при 37°C в течение 1 часа, 6 часов, 12 часов и 24 часов. C4 и расщепленный усеченный фрагмент C4 детектировали с использованием антитела к цепи C4α. (E) C4 инкубировали с MASP-2, MBL, маннаном, N-белками, C1INH или моноклональным антителом к MASP-2 при 37°C в течение 1 часа. C4 и расщепленный C4 детектировали с использованием антитела к цепи C4α. (F-H) Осаждение C4b по отношению к концентрации N-белков SARS-CoV, HCoV-229E, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

Фигура 3. N-белки стимулируют ЛПС-индуцированную пневмонию in vivo

(A) Мышей BALB/c (10/группу) инфицировали 1×10⁹ БОЕ Ad-SARS N/Ad-null или контрольным физиологическим раствором через хвостовую вену, и ЛПС (5 мг/кг) вводили через хвостовую вену на 6-й день. Антитело к MASP-2 (200 мкг/кг) или C1INH (4 мг/кг) вводили путем инъекции через хвостовую вену за 30 минут до инъекции ЛПС. Отмечали

смертность мышей, *P<0,05 и **P<0,01 согласно критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Срезы легких в парафине анализировали с помощью окрашивания гематоксилином/эозином (HE) (B). Мышей инфицировали 1×10^8 БОЕ Ad-SARS N/Ad-null через хвостовую вену, и ЛПС (5 мг/кг) вводили капельно в нос и через хвостовую вену на 6-й день. Мышей умерщвляли через 6 часов после иммунизации ЛПС. Замороженные срезы легких окрашивали антителом к C4b (C). Образование комплекса SARS-CoV N и MASP-2 измеряли в замороженных срезах легких с помощью *in situ* PLA, как указано красными знаками. Осажденные фрагменты C3 окрашивали FITC-мечеными антителами к C3c (зеленый), масштабная полоса = 50 мкм (D). (E) Мышей предварительно инфицировали 1×10^9 БОЕ Ad-MERS N/Ad-null и обрабатывали ЛПС, антителом или C1INH, как упоминалось выше, за выжившими мышами наблюдали. (F) Мышей Masp2^{-/-} и Masp2^{+/+} C57BL/6N инфицировали N-экспрессирующим аденовирусом и вводили путем инъекции ЛПС, как упоминалось выше, за выжившими мышами наблюдали.

15 **Фигура 4. Активация комплемента у пациентов, страдающих COVID-19**

(A-E) Фиксированные параформальдегидом ткани легких после посмертного вскрытия использовали для приготовления парафиновых срезов тканей и иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к MBL, к MASP-2, к цепи C4 α , к C3 или C5b-9. Микрофотографию проводили с помощью микроскопа Olympus BX52 под 10 \times объективом. (F) Сывороточный C5a от здоровых людей, пациентов, страдающих COVID-19 легкой или тяжелой степени тяжести, анализировали с помощью ИФА.

Фигура 5. Лечение пациентов, страдающих COVID-19, антителом к C5a

(A) Временная шкала начала болезни, детектирования РНК SARS-CoV-2 и госпитализации двух пациентов. (B) Скорость потока, фракция вдоха (FiO2) высокопоточного назального кислорода, чрескожное насыщение кислородом (SpO2) и индекс оксигенации (PaO2/FiO2) или SpO2/FiO2 у пациента №1 (слева) и пациента №2 (справа). (C) Изменения температуры тела (ТЕМП), уровня С-реактивного белка (СРБ) и количества лимфоцитов в крови (ЛИМ) у пациента №1 (слева) и пациента №2. (D) Изменения функции печени у пациента №1 (слева) и пациента №2 (справа). АЛТ: аланинаминотрансфераза АСТ: аспаргатаминотрансфераза; ОБ: общий белок; АЛБ: альбумин.

35 **Фигура 6. Схематическое представление пути MBL, сверхактивированного N-белком SARS/MERS-CoV или SARS-CoV-2**

(А) Вирус связывается с поверхностью клетки, и S-белок активирует MBL. (В) Вирус попадает в клетки и экспрессирует вирусные белки, включая N-белок. (С) N-белки высвобождаются после лизиса клеток путем репликации вируса и атаки иммунной системы. (D) Внеклеточные растворимые димеры N-белка взаимодействуют с MASP-2, индуцируют аутоактивацию MASP-2 и связывание с MBL. (E) Ускоренная активация MASP-2 индуцирует сверхактивацию каскадов комплемента, лежащих ниже пути MBL, и способствует лизису клеток и высвобождению N-белка путем секреции или опосредуемой комплементом цитотоксичности, что может привести к неконтролируемому повреждению тканей и воспалению.

10 **Фигура 7. Идентификация ключевого мотива N-белка, участвующего во взаимодействии с MASP-2.**

(А) Домены и мутанты MASP-2 и N-белка SARS-CoV. (В) Лизаты из клеток 293Т, трансфицированных полноразмерным GFP-N (1-422) и его усеченными мутантами 1-176, 176-251, 252-361 и 362-422, подвергали иммунопреципитации с MASP-2-Flag-конъюгированными гранулами агарозы в присутствии 2 мМ CaCl₂ и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антитела к GFP и антитела к Flag. Гранулы против Flag, инкубированные с лизатами из клеток, трансфицированных Flag-вектором (pCDNA3-Flag), использовали в качестве отрицательного контроля. (С) Анализ димеризации N-белка методом иммунопреципитации. Лизаты из клеток 293Т, экспрессирующих Flag-меченый SARS-CoV N, HCoV-229E N или мутантов SARS-CoV N (Δ281-322, Δ321-323), инкубировали с гранулами агарозы против Flag, и N-конъюгированные гранулы агарозы уравнивали и подвергали иммунопреципитации с лизатами из клеток 293Т, экспрессирующих соответствующий GFP-меченый N-белок, и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антитела к GFP. (D) Сравнение последовательностей SARS-CoV N, MERS-CoV N, HKU5-CoV N, SARS-CoV-2 N и Bat-SARS подобного-CoV N. Элементы вторичной структуры определяются на основе алгоритма ESPript. Линии обозначают спирали, а стрелки представляют β-цепи.

Фигура 8.

30 N-белки SARS-CoV и MERS-CoV ускоряют каскад лектинового пути комплемента. (А) Скорость расщепления C4, упомянутая на Фиг. 2D, была рассчитана по формуле усеченный C4/ (усеченный C4+оставшийся C4)×100% после денситометрического анализа и построения графика. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех тестов. *P<0,05 и **P<0,01 согласно непарному двустороннему t-критерию Стьюдента. (В) Денситометрический анализ скорости расщепления C4, упомянутый на Фиг. 2E. (С) C4 инкубировали с MASP-2, MBL, маннаном, N-белком MERS-CoV или мутантным N-белком при 37°C в течение 1 часа или 2 часов. C4 и

расщепленный фрагмент C4 измеряли с использованием антитела к цепи C4 α . (D) Осаждение активированного C3 в обедненной C1q сыворотке, разведенной в буфере с Ca-Mg (LP+AP) или Mg-ЭГТА (только AP), по отношению к концентрации N-белка. (E) Осаждение активированного C3 по отношению к концентрации N-белка. (F) Осаждение C5b-9 по отношению к концентрации N-белка. (G) Опсоноцитофагический тест макрофагов мыши в сыворотке в присутствии или в отсутствие нуклеокапсидного белка SARS-CoV. ЧСА использовали в качестве отрицательного контроля. Точки представляют собой средние значения из двух повторных экспериментов. Планки погрешностей, среднее значение \pm стандартное отклонение *P<0,05 и **P<0,01 согласно непарному двустороннему t-критерию Стьюдента.

Фигура 9.

Нуклеокапсидный белок SARS-CoV ускоряет каскад лектинового пути комплемента *in vivo*. (A) Мышей инфицировали три раза (день 1, 2, 3) 1×10^8 БОЕ Ad-N/Ad-null через хвостовую вену, и ЛПС (5 мг/кг) вводили капельно в нос и через хвостовую вену на 6-й день. Мышей умерщвляли через 6 часов после иммунизации ЛПС. Образование комплекса SARS-CoV N и MASP-2 измеряли в замороженных срезах легких с помощью *in situ* PLA с использованием козьего антитела к MASP-2, мышинового антитела к N-белку и соответствующих вторичных реагентов, как указано красными знаками. Осажденные фрагменты C3c окрашивали FITC-мечеными антителами к C3c (зеленый). Ядра (синий) контрастировали с использованием DAPI. ЛПС+Ad-null представляли собой мышей для отрицательного контроля ЛПС+Ad-N, показанных на Фиг. 3D. (B) Диаграмма для мыши, нокаутной по гену *Masp2*. Для создания модели на мышах, нокаутных по *Masp2* (C57BL/6N), с помощью CRISPR/Cas-опосредуемой геномной инженерии в качестве целевых сайтов были выбраны экзоны 9-11 гена *Masp2* мыши.

Фигура 10

Компьютерная томография грудной клетки двух пациентов. Показаны планарные структуры с наиболее тяжелым поражением. КТ-сканирование у пациента №1 показало, что тяжелая пневмония возникла в другой области легких по сравнению с 6 днем до введения антитела к C5a.

Реферат:

Чрезмерный иммунный ответ вносит вклад в патогенез и летальность SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, но механизм остается неясным. В этом исследовании было обнаружено, что N-белки SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 связываются с MASP-2, ключевой сериновой протеазой в лектиновом пути активации комплемента, что приводит к конститутивной активации комплемента и усугублению воспалительного поражения легких. Как блокирование взаимодействия N-белка и MASP-2, так и подавление активации комплемента может значительно облегчить индуцированную N-белком гиперактивацию комплемента и поражение легких *in vitro* и *in vivo*. Гиперактивацию комплемента также наблюдали у пациентов, страдающих COVID-19, и многообещающий подавляющий эффект наблюдали при лечении моноклональным антителом к C5a пациентов с ухудшением. Подавление комплемента может представлять собой обычный терапевтический подход для лечения пневмонии, индуцированной этими высокопатогенными бета-коронавирусами. Лектиновый путь активации комплемента является мишенью для лечения пневмонии, индуцированной высокопатогенными коронавирусами.

Введение

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS), о котором первоначально сообщалось в Гуандуне, Китай, в ноябре 2002 года, является крайне заразным и смертоносным респираторным заболеванием (1, 2). Коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), был идентифицирован как новый этиологический агент этого заболевания. Почти через десять лет после вспышки SARS новый зоонозный коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV), был идентифицирован как этиологический агент ближневосточного респираторного синдрома (3). Недавно новый коронавирус, SARS-CoV-2, был впервые обнаружен в Ухане, Китай, и быстро распространился на другие провинции Китая и по всему миру. По состоянию на 18 марта 2020 года SARS-CoV-2 инфицировал более 180000 человек с показателем смертности 3,9%. Инфекция вируса вызывала тяжелую атипичную пневмонию, сходную с инфекцией SARS-CoV (4). Несмотря на то, что патогенез этих заболеваний активно изучается, до сих пор неясно, почему вирусные инфекции приводят к дыхательной недостаточности с высоким показателем смертности (5). Нуклеокапсидный белок (N) SARS-CoV представляет собой вирусный РНК-связывающий белок массой 46 кДа, обладающий только 20-30% гомологии с N-белками других известных коронавирусов (6), в то время как N-белки

высокопатогенных коронавирусов более сходны, включая SARS-CoV-2 (91%) и MERS-CoV (51%) согласно BLASTP (5, 7) (8). N-белок является одним из наиболее распространенных вирусных структурных белков в образцах сывороток пациентов во время инфекции SARS-CoV (9). Потенциально, N-белок играет некоторую роль в патогенезе вируса, поскольку предварительное введение N-белка, но не других вирусных белков, посредством рекомбинантного вируса осповакцины (10) или частиц репликона вируса венесуэльского энцефалита лошадей (11) приводило к тяжелой пневмонии у пожилых мышей, иммунизированных SARS-CoV.

Система комплемента функционирует как система иммунного надзора, которая быстро отвечает на инфекцию. Активация системы комплемента приводила к устранению патогена, регуляции воспаления адаптивными иммунными ответами. Но нарушенная регуляция активации комплемента связана с развитием острых заболеваний легких, индуцированных высокопатогенными вирусами (12, 13). Система комплемента может быть активирована за счет классического пути (CP), лектинового пути (LP) или альтернативного пути (AP) (14). В LP маннан-связывающий лектин (MBL) (или фиколины) связывается с углеводными массивами остатков маннана и N-ацетилглюкозамина на поверхностях вирусов или поверхностях инфицированных вирусом клеток, что приводит к активации MBL-ассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2), единственной известной MBL-ассоциированной протеазы, которая может непосредственно инициировать каскад комплемента (15, 16). MBL связывается с клетками, инфицированными SARS-CoV, дозозависимым, кальций-зависимым и ингибируемым маннаном образом *in vitro*, усиливая осаждение C4 комплемента на SARS-CoV (17). Сайт N-связанного гликозилирования N330 на шиповидном белке (S) SARS-CoV является критическим для специфичных взаимодействий с MBL (18). Хотя у пациентов с SARS были обнаружены более высокие уровни активированных фрагментов C3 и C4 комплемента, что указывает на активацию путей комплемента (19, 20), механизм индуцированной SARS-CoV активации комплемента недостаточно изучен. Также неизвестно, возникает ли сходный патогенез при инфекции SARS-CoV-2.

Ранее авторы продемонстрировали, что N-белок взаимодействует с рядом белков хозяина, включая MAP19 (22), продукт альтернативного сплайсинга MBL-ассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2). Таким образом, в данном исследовании были интенсивно изучены взаимодействия N-белков SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 с MASP-2, а также были выяснены патологические эффекты этих взаимодействий на иммунитет хозяина и воспаление, которые обеспечивают поддержку

механизма для терапии на основе иммуномодуляции против текущей эпидемии COVID-19.

Результаты

5 N-белки SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV взаимодействуют с MASP-2

Для изучения связывания между N-белком SARS-CoV и MASP-2 и для определения взаимодействующих доменов двух белков лизаты клеток человека 293T, экспрессирующих Flag-меченый полноразмерный MASP-2, N-концевую область CUB1-EGF-CUB2 или C-концевую область CCP1-CCP1-SP (Фиг. 7A), подвергали
10 иммунопреципитации против Flag с использованием конъюгированных с антителом к Flag гранул агарозы. Затем иммунопреципитаты инкубировали с лизатами клеток 293T, экспрессирующих GFP-меченый N-белок SARS-CoV (GFP-SARS N) или усеченные мутанты, в присутствии 2 mM CaCl₂ или 1 mM ЭДТА. Адсорбаты зондировали антителом к Flag или антителом к GFP с помощью иммуноблоттинга. Ассоциации между Flag-
15 MASP-2 и GFP-SARS N наблюдали только в присутствии CaCl₂ (Фиг. 1A) в соответствии с потребностью в Ca²⁺ для связывания MASP-2-MBL и аутоактивации MASP-2. Область CCP1-CCP2-SP MASP-2 (Фиг. 1A) и N-концевой домен (остатки 1-175) N-белка (Фиг. 7A и Фиг. 7B) имели решающее значение для ассоциации, в то время как отрицательные контроли или другие усеченные области не связывались, и GFP-меченый полноразмерный
20 или усеченный N-белок не подвергался совместной иммунопреципитации с гранулами, конъюгированными с IgG мыши (Фиг. 1A и Фиг. 7B).

N-белок SARS-CoV можно детектировать в сыворотке пациента уже через 1 день после появления симптомов (24). Для моделирования ассоциаций N-белка SARS-CoV в сыворотке Flag-меченый N-белок (1 нг/мл) добавляли к сыворотке человека или мыши и осаждали с гранулами агарозы, конъюгированными с антителами к Flag. N-белок SARS-
25 CoV взаимодействовал с MASP-2, полученным из сыворотки человека или мыши (Фиг. 1B). Дальнейший анализ усечения и делеции показал, что аминокислотные остатки 116-124, которые расположены в спиральном мотиве N-белка SARS-CoV (остатки 115-130), были незаменимы для взаимодействия с MASP-2 (Фиг. 1C). Однако ассоциация MASP-2 с
30 SARS-CoV NΔ321-323, мутантом, который не образует димер N-белка (Фиг. 7C), не затрагивалась в значительной степени (Фиг. 1C).

Ключевой мотив в N-белке SARS-CoV для взаимодействия с MASP2 (остатки 116-124) имеет высокую идентичность с соответствующим мотивом в SARS-CoV-2 N (115-123) и MERS-CoV N (104-112) (Фиг. 7D), это свидетельствует о том, что N-белок SARS-
35 CoV2 и MERS CoV также будет взаимодействовать с MASP2. Как и ожидалось, оба

экзогенно экспрессированных MERS-CoV N и SARS-CoV-2 N ассоциировались с MASP-2 (Фиг. 1D и 1E), и мутант MERS-CoV N с делецией $\Delta 104-112$ показал прогнозируемую сниженную ассоциацию (Фиг. 1D). Таким образом, для связывания MASP-2 важен общий мотив среди N-белков коронавируса.

5
N-белки SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 стимулируют MASP-2-зависимую активацию комплемента

10 Домены CCP1-CCP2-SP MASP-2 отвечают за самоактивацию и активность связывания субстрата, что, в свою очередь, опосредует активацию лектинового пути комплемента (25). Ассоциация MASP-2:N-белок SARS-CoV, продемонстрированная выше, свидетельствует о том, что N-белок может регулировать активацию и расщепление MASP-2, требующие димеризации. Чтобы продемонстрировать связывание MASP-2:MASP-2, гранулы, конъюгированные с MASP-2 и меченые Flag, инкубировали с лизатами клеток 293T, экспрессирующих Мус-меченый MASP-2, в присутствии/в
 15 отсутствие N-белка и MBL. Связывание MASP-2-Мус с MASP-2-Flag стимулировалось N-белком SARS-CoV при приблизительно равной молярной стехиометрии (Фиг. 2A). Затем очищенный MASP-2-Flag инкубировали с маннаном и MBL с N-белком SARS-CoV или без него. Более высокие уровни расщепленных фрагментов MASP-2 (остатки 445-686) в результате аутоактивации MASP-2 получили в присутствии N-белка SARS-CoV (Фиг. 2B).

20 Для изучения влияния N-белка SARS-CoV на способность MASP-2 связывать MBL очищенные MBL и MASP-2 (26) инкубировали в лунках микропланшета, покрытых маннаном, при 4°C, чтобы избежать активации MASP2, и динамику связывания MASP-2:MBL оценивали с использованием антитела к MASP2. По сравнению с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), компонентом с высокой концентрацией в буфере для связывания, используемым в качестве отрицательного контроля для N-белка, связывание
 25 MASP-2 с MBL было значительно усилено в присутствии N-белка SARS-CoV в относительно низкой концентрации (1%~0,1% MASP2) и Ca²⁺, и стимуляция эффективно обращалась вспять антителом к N-белку (Фиг. 2C). Кроме того, N-белок SARS-CoV, несущий делецию $\Delta 116-124$ или $\Delta 321-323$, или N-белок из менее патогенного
 30 коронавируса человека 229E-CoV, показал незначительное влияние или отсутствие влияния на связывание MASP-2:MBL по сравнению с полноразмерным N-белком SARS-CoV (Фиг. 2C). Эти результаты показали, что активация MASP-2, стимулированная N-белком SARS-CoV, зависит не только от ассоциации с MASP-2, но и от димеризации N-белка.

MASP2 расщепляет компоненты комплемента C2 и C4 с образованием C3-конвертазы в лектиновом пути системы комплемента при активации. Далее оценивали влияние N-белка SARS-CoV на активацию лектинового пути комплемента с помощью расщепления C4. Очищенный C4 инкубировали с MASP-2, маннаном, MBL в присутствии/в отсутствие равного молярного количества N-белка, и наблюдали, что расщепление C4 значительно стимулируется N-белком SARS-CoV в присутствии маннана и MBL (Фиг. 2D и Фиг. 8A). Соответственно, мутанты N-белка SARS-CoV (Δ 116-124 и Δ 321-323), а также N-белок из H229E-CoV были неспособны стимулировать MASP-2-опосредуемый гидролиз C4 (Фиг. 2E и Фиг. 8B). Примечательно, что моноклональное антитело к MASP-2 или C1INH, ингибитор MASP-2 (27), блокировали гидролиз C4, стимулированный SARS-CoV, это свидетельствовало о том, что расщепление C4, стимулированное N-белком, зависело от активации MASP-2 (Фиг. 2E и Фиг. 8B). Кроме того, MERS-CoV N также стимулировал расщепление C4 (Фиг. 8C). Эти результаты показали, что N-белок вызывает расщепление C4 и, следовательно, активацию комплемента посредством ассоциации и активации MASP-2.

Влияние N-белка SARS-CoV на активацию комплемента за счет лектинового пути далее изучали с помощью анализов осаждения комплемента. Очищенный C4 инкубировали с иммобилизованным комплексом MBL и MASP-2 в присутствии указанного N-белка. N-белок SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV2, но не H229E-CoV N, стимулировал осаждение C4b, которое зависело от активности MASP 2, дозозависимым образом (Фиг. 2F, Фиг. 2G и Фиг. 2H). Затем иммобилизованный маннан инкубировали с обедненной C1q сывороткой (для устранения классического пути) (28) в присутствии/в отсутствие N-белка SARS-CoV, и осажденные фрагменты C3 (C3b, iC3b и C3dg) детектировали с помощью антитела к активированному C3. В сочетании с осаждением C4b осаждение активированного C3 явно увеличивалось вместе с увеличением уровней N-белка SARS-CoV до ~40 нМ (Фиг. 8D), это указывает на повышенную активность C3-конвертазы. Осаждение C3b снижалось в присутствии высокой концентрации N-белка (Фиг. 8D и 8E), возможно, за счет дальнейшего расщепления C3b растворимыми ингибиторами в сыворотке (такими как фактор H и фактор I), когда поверхность покрыта C3b с высокой плотностью (29, 30). Кроме того, N-белок SARS CoV оказывал незначительное влияние или не влиял на осаждение активированного C3 в буфере без кальция, содержащем ЭГТА, это позволяет предположить, что активация C3, стимулированная N-белком SARS CoV, происходит по лектиновому пути (LP), но не по альтернативному пути (AP), в котором активация C3 не зависит от Ca²⁺ (Фиг. 8E). Мы также протестировали осаждение комплекса C5b 9. В результате амплифицированных

каскадов комплемента значительно повышенное осаждение комплекса было индуцировано N-белком SARS-CoV в гораздо более низкой концентрации, сходной с той, которая наблюдалась в сыворотках пациентов (Фиг. 8F) (24).

Активированный комплемент играет решающую роль в эффективном фагоцитозе патогенов и клеточного дебриса посредством опосредуемой C3b или C5b опсонизации (31). Для исследования комплементзависимого фагоцитоза *E. coli* и перитонеальные макрофаги мыши инкубировали вместе в разбавленной C1q-обедненной сыворотке с N-белком SARS-CoV или без него. Связанный C3 или его большой фрагмент C3b, продукт после расщепления C3, окрашивали FITC-меченым антителом к C3c, и FITC-положительные макрофаги, содержащие C3-конъюгированную *E. coli*, подсчитывали под микроскопом. В сочетании с активацией комплемента комплементзависимый фагоцитоз перитонеальными макрофагами мышей в присутствии мышинной сыворотки, содержащей компонент комплемента, включая MASP-2, был усилен N-белком SARS-CoV по сравнению с контролем ЧСА (Фиг. 8G). Эти результаты показали, что N-белок SARS-CoV эффективно вызывал активацию и опсонический эффект системы комплемента посредством неклассического пути.

N-белки SARS-CoV и MERS-CoV усугубляют ЛПС-индуцированную пневмонию за счет активации комплемента с участием MASP-2

Постоянная активация комплемента приводит к неконтролируемому воспалению. Для изучения влияния активации MASP-2, стимулированной N-белком, на воспаление мышей предварительно инфицировали аденовирусом (1×10^9 БОЕ), экспрессирующим SARS-CoV N (Ad-SARS N) или его мутант, или только аденовирусным носителем (Ad-null). Затем мышей иммунизировали ЛПС, который содержит MBL-связывающие мотивы, для активации LP и индукции воспаления (32). 8 из 10 мышей, предварительно подвергшихся воздействию аденовирусного носителя, выжили после иммунизации 5 мг/кг ЛПС (Фиг. 3A), в то время как все 10 мышей, предварительно подвергшихся воздействию Ad-SARS N, умерли в течение 12 часов после введения ЛПС в той же дозировке (Фиг. 3A). У мертвых мышей также наблюдали тяжелое повреждение легких и обширную инфильтрацию воспалительных клеток (Фиг. 3B). В сочетании с предыдущими результатами предварительное инфицирование Ad-229E N и Ad-SARS N, несущим делецию $\Delta 116-124$ или $\Delta 321-323$ в N-белке, соответственно, оказывало значительно меньшее влияние на смертность мышей. Важно отметить, что когда антитело к MASP-2 или C1INH вводили одновременно с введением ЛПС у мышей, предварительно инфицированных Ad-SARS N, ЛПС-индуцированный показатель смертности был

значительно снижен (Фиг. 3А). У этих мышей также наблюдали тяжелое повреждение легких и обширную инфильтрацию воспалительных клеток (Фиг. 3В). Эти результаты в совокупности демонстрируют, что N-белок SARS-CoV значительно усиливал ЛПС-индуцированное воспаление за счет активации MASP-2, которая тем самым инициирует реакцию каскада комплемента с участием лектинового пути.

Для изучения активации комплемента у мышей, индуцированной ЛПС и N-белком, мышей, предварительно инфицированных Ad-SARS N (1×10^8 БОЕ), иммунизировали ЛПС (5 мг/кг). Через 6 часов после введения ЛПС мышей умерщвляли, и фиксированную параформальдегидом ткань легких подвергали иммуногистохимическому окрашиванию антителом к C4b (Фиг. 3С) или иммунофлуоресцентному анализу с FITC-меченым антителом к C3c (Фиг. 3D). Осаждение C4b и активированного C3 в легких было значительно увеличено у мышей, экспрессирующих N-белок SARS-CoV, по сравнению со слабым окрашиванием в легких мышей, получавших ЛПС и Ad-null (Фиг. 3 С и D).

Ассоциацию *in vivo* MASP-2 с N-белком дополнительно оценивали с помощью анализа проксимального лигирования *in situ* (PLA) с антителами к N и к MASP-2 (Фиг. 3D, Фиг. 9А), при этом красные пятна, которые детектировались только тогда, когда SARS-CoV N и MASP-2 связывались друг с другом, наблюдали в большом количестве в легочных клетках мышей, экспрессирующих SARS-CoV N, но не животных для отрицательного контроля. Эти результаты подтвердили непосредственное связывание *in situ* и активацию MASP-2 под действием SARS-CoV N в ткани легких мышей.

Сходным образом, ЛПС-иммунизированные мыши страдали серьезной пневмонией и 100% умерли в течение 24 часов при предварительном инфицировании аденовирусом, экспрессирующим N-белок MERS-CoV (Ad-MERS N), но не его мутант $\Delta 104-112$ (Ad-MERS $\Delta 104-112$), в течение 7 дней, которая частично излечивалась С1ПН и антителом к MASP-2 (Фиг. 3Е). Эти результаты показывают, что N-белок применяется как SARS-CoV, так и MERS-CoV для стимуляции активации комплемента посредством MASP-2-опосредуемого лектинового пути.

Патогенность N-белка далее изучали с использованием мышей, нокаутных по *masp2* и с дефицитом активности протеазы MASP-2, аналогичным образом (Фиг. 9б). Мышей предварительно инфицировали Ad-SARS N или Ad-MERS N (1×10^8 БОЕ) в течение 5 дней, а затем иммунизировали ЛПС. По сравнению с мышами дикого типа мыши, нокаутные по *masp2*, выживали дольше и имели более высокие показатели выживаемости (Фиг. 3F), которые могут быть отнесены к нарушенной активации комплемента из-за дефицита MASP-2.

Каскад комплемента сверхактивирован в легких пациентов, страдающих COVID-19

Поскольку SARS-CoV и SARS-CoV-2 индуцируют только легкое повреждение легких у мышей, а исследование с живым SARS-CoV, включая адаптированный к мышам SARS-CoV, не разрешено регламентом, были получены клинические доказательства того, что у пациентов, страдающих COVID-19, произошла сверхактивация лектинового пути комплемента. Фиксированную параформальдегидом ткань легких пациентов, умерших от COVID-19, собирали и подвергали иммуногистохимическому окрашиванию антителами к MBL, MASP-2, C4 α , C3 или C5b-9. MBL, MASP-2, C4, C3 и C5b-9 в ткани легких пациентов имели сильное положительное окрашивание (Фиг. 4), это позволяет предположить, что компоненты комплемента осаждались в клетках альвеолярного эпителия типа I и типа II, а также воспалительных клетках, некоторых гиперпластических пневмоцитах и экссудатах в альвеолярных пространствах с дебрисом некротических клеток. Кроме того, у пациента, страдающего COVID-19, в частности, у критических пациентов, также наблюдали значительно повышенный сывороточный уровень C5a. Эти результаты показывают, что пути комплемента были агрессивно активированы в легких пациентов, страдающих COVID-19.

Нацеленная на комплемент терапия показывает многообещающий лечебный эффект против COVID-19

Чрезмерный воспалительный и цитокиновый шторм может вносить вклад в тяжесть и летальность COVID-19, что может быть отнесено к неограниченной активации пути комплемента. Следовательно, отрицательная регуляция MASP-2, а также его нижележащих сигнальных молекул, таких как сильный анафилатоксин C5a, может обеспечить новый подход к борьбе с пневмонией, индуцированной SARS-CoV-2.

Основываясь на наших результатах и их перспективности и применении в терапии COVID-19, рекомбинантное антитело к C5a, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 34 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 35 (антитело IgG с этими варибельными областями, выращенное из одной и той же клеточной линии, называется взаимозаменяемо IFX-1 или BDB-001), которое проходило клиническое исследование фазы II для лечения гнойного гидраденита, было быстро одобрено Национальным управлением по изделиям медицинского назначения (NMDA) для клинического исследования фазы II для лечения COVID-19 (2020L0003). «Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование у пациентов с COVID-19 легкой степени тяжести» и открытое «клиническое исследование в двух когортах у пациентов с COVID-19 тяжелой и

критической степени тяжести» проводили одновременно с одобрения Комитета по этике больницы Хуошеншань с информированным согласием пациентов. В то время как большой набор данных от большего числа пациентов в когорте COVID-19 будет сообщен в другом месте после завершения исследования, в настоящей заявке мы сообщаем о
5 первых 2 пациентах, которые получали терапию антителом к С5а в открытом исследовании.

Пациент № 1, 54-летний мужчина, проживающий в городе Ухань, был госпитализирован в больницу Дунсиху на 4 день после появления симптомов (5 день болезни) с лихорадкой. Инфекция SARS-CoV-2 была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР в
10 реальном времени для SARS-CoV-2, и КТ-сканирование грудной клетки показало двустороннее помутнение. Заболевание ухудшалось с 9 дня болезни с сильной лихорадкой ($38,7^{\circ}\text{C}\sim 39,8^{\circ}\text{C}$), $\text{SpO}_2 < 93\%$ на воздухе в помещении, прогрессированием пневмонии на КТ-сканировании и тяжелым повреждением печени. Преднизон (40 мг/сутки в течение 4 дней) вводили на 10-13 день болезни, но состояние ухудшилось, поэтому пациент был
15 переведен в больницу Хуошеншань Уханя, новую больницу, срочно созданную для пациентов, страдающих COVID-19 тяжелой степени тяжести, на 14 день болезни (Фиг. 5А), и считался тяжелым случаем в критическом состоянии с умеренным ОРДС (индекс оксигенации < 150), частотой дыхания 30/мин и чрескожным насыщением кислородом (SpO_2), которое снижалось до 77% при воздействии комнатного воздуха в течение 1
20 минуты. Была предоставлена поддерживающая терапия, включая высокопоточный назальный кислород (HFNO) для достижения целевого $\text{SpO}_2 > 95\%$ (Фиг. 5В, слева). Ему также вводили антибиотики (моксифлоксацин) и человеческий сывороточный альбумин, в то время как введение преднизона было прекращено. Лечение моноклональным антителом к С5а (BDB001) начали утром 15 дня болезни. Антитело вводили внутривенно в 250 мл
25 физиологического раствора в дозировке 300 мг/сутки на день 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 и 13. Нежелательные явления не наблюдались, и клиническое состояние улучшилось в последующие дни, при этом наблюдали нормальную температуру тела вечером того же дня (Фиг. 5С, слева), повышенный индекс оксигенации ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) (Фиг. 5В, слева) и количество лимфоцитов (Фиг. 5С, слева), пониженную концентрацию С-реактивного
30 белка (СРБ) (Фиг. 5С, слева) и значительно улучшенную функцию печени (показано снижением уровня АЛТ, АСТ и повышенной концентрацией общего сывороточного белка и сывороточного альбумина, Фиг. 5D, слева). Фракция вдоха O_2 и скорость потока газа для высокопоточного назального кислорода (HFNO) в конечном итоге была уменьшена с самого высокого (80%, 40 л/мин до 30%, 20 л/мин) до целевого значения $\text{SpO}_2 > 95\%$ (Фиг.
35 5В, слева). Из-за высокого риска проведения КТ-сканирования у пациента в критическом

состоянии во временно созданной больнице (расстояние и дождливая погода) КТ-сканирование непосредственно перед введением антитела к С5а не было доступно для оценки. Тем не менее, пневмония значительно улучшилась через 20 дней после 1 дозы по сравнению с 10 днями после 1 дозы (Фиг. 10).

5 Пациент №2, 67-летний мужчина, был госпитализирован в шестую больницу на 5 день после появления симптомов (6 день болезни) с лихорадкой и кашлем. КТ-сканирование показало непрозрачность верхней доли левого легкого (Фиг. 10). Инфекция SARS-CoV-2 также была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени на 11 день болезни. Противовирусные препараты (арбидол) и антибиотики (моксифлоксацин) 10 вводили вместе с другим поддерживающим лечением. Состояние ухудшилось к 8-му дню с тяжелым кашлем и сильной лихорадкой (39,7°C, Фиг. 5С, справа). Метилпреднизолон (40 мг/сутки, в течение 7 дней с 8 дня после начала болезни) показал незначительное улучшение симптомов, если таковое имело место. Пациент был переведен в больницу Хуошеншань Уханя на 10 день (Фиг. 5А), и болезнь продолжила ухудшаться, о чем 15 свидетельствует SpO₂ (<90% на воздухе в помещении на 14 день), сильная лихорадка (>39°C на 10-13 день, Фиг. 5С справа) и пневмония на КТ грудной клетки на 11 день болезни (Фиг. 10). Пациенты сообщили о тяжелом кашле, стеснении в груди и одышке. Необходимо давать HFNO для поддержания SpO₂>95%. Антитело к С5а вводили утром на 14 день болезни и продолжали, как у пациента №1. Впоследствии в тот же день 20 наблюдали нормальную температуру (Фиг. 5С справа). Сообщалось, что на следующий день (день 15 болезни) кашель, одышка и угнетение в грудной клетке улучшились. В последующие дни также наблюдали значительное снижение уровня С-реактивного белка (СРБ), значительное увеличение числа лейкоцитов и лимфоцитов (Фиг. 5С, справа). Постепенно улучшалась функция печени (Фиг. 5D справа, данные на 15 день 25 недоступны). Скорость потока и фракция вдоха O₂, необходимые для поддержания SpO₂>95%, постепенно снижались с увеличением SpO₂/FiO₂ (Фиг. 5В справа). КТ грудной клетки на 26 день (через 12 дней после введения 1 дозы) также показала уменьшение пневмонии (Фиг. 5В).

30 Эти данные свидетельствуют о том, что 2 пациента получили значительную пользу от терапии моноклональным антителом к С5а.

Обсуждение

35 За последние 17 лет последовательно возникающие SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 преодолели видовой барьер и принесли новые инфекционные заболевания и социальную панику у людей. Все эти высокопатогенные коронавирусы вызывают острое

поражение легких и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), что приводит к повышенной тяжести и летальности. У пациентов, инфицированных вирусом, может развиться атипичная пневмония, вызванная тяжелым иммунным поражением. Считается, что чрезмерные иммунные ответы человека, которые характеризовались чрезмерным высвобождением провоспалительных цитокинов и хемокинов, называемым «цитокиновым штормом» (5), являются основным инициатором тяжелой пневмонии, вызванной высокопатогенным коронавирусом, включая последний SARS-CoV-2(4). Хотя иммунопатогенез частично причастен к SARS или MERS, механизм, ответственный за индуцированную вирусом гиперактивацию иммунной системы хозяина, остается мало изученным.

В настоящей заявке авторы настоящего изобретения раскрыли, что SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 имеют общий механизм, соединяющий вирусные N-белки со связыванием и стимуляцией MBL, Ca²⁺-зависимой аутоактивации MASP-2, что приводит к неконтролируемой активации каскада комплемента, осаждению комплемента и усиленному расщеплению C4 (Фиг. 1-2 и 6). Связывание N-белка с MASP-2 усиливает эффекты MASP-2-опосредуемой активации лектинового пути. Мутанты N-белка либо не способны взаимодействовать с MASP-2, либо не образуют N-димер и незначительно влияют или не влияют на MASP-2-опосредуемую активацию лектинового пути (Фиг. 1C и D), это свидетельствует о том, что эффекты N-белка зависят от связывания и димеризации.

Будучи «обоюдоострым мечом», комплемент является критическим для врожденного иммунитета против патогенов. Анафилатоксины, такие как C3a и C5a, могут активировать иммунные клетки и, следовательно, индуцировать высвобождение различных цитокинов. Активированный каскад комплемента продуцирует цитолитический конечный комплекс комплемента C5b-9 и фрагменты C3b и C5b (31, 33). Эти пептиды индуцируют синтез метаболитов арахидоновой кислоты, включая простагландин (PG) E₂, тромбоксан B₂ и лейкотриены (32, 34), которые дополнительно индуцируют привлечение и активацию нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов и стимулируют продукцию ряда провоспалительных цитокинов и медиаторов (35). Эти цитокины запускают и поддерживают воспалительные процессы и помогают врожденному иммунитету бороться с вирусом. Тем не менее, активация врожденного иммунитета с вовлечением комплемента должна быть точно настроена, поскольку неограниченная активация комплемента всегда способствует диссеминированному внутрисосудистому свертыванию (ДВС), воспалению, гибели клеток и иммунному параличу и в конечном итоге приводит к полиорганной недостаточности и гибели.

Неожиданный результат о том, что N-белок коронавируса стимулирует активацию комплемента, дает новое представление о причинах пневмонии, индуцированной инфекцией SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Кроме того, мы также обнаружили, что предварительная инфекция Ad-SARS N или Ad-MERS N явно увеличивала смертность от ЛПС-индуцированной пневмонии (Фиг. 3), Возможно, это также усугубляет повреждение тканей, вызванное большим количеством ЛПС, высвобождаемым при вторичных бактериальных инфекциях (37, 38).

Вовлечение опосредуемого N-белком MASP-2 и, следовательно, сверхактивации каскада комплемента в патогенез коронавируса обеспечивает стратегию применения известных ингибиторов пути C5a/C5aR и, таким образом, новых способов лечения SARS, MERS или последнего COVID-19. Во-первых, нейтрализация N-белка в сыворотке антителом эффективно облегчала поражение легких и снижала летальность у мышей, иммунизированных ЛПС/Ad-SARS N или ЛПС/Ad-MERS N. По случайному совпадению, пациенты с SARS, у которых продуцируются более высокие уровни антител, специфичных в отношении N-белка, но не специфичных в отношении шиповидного белка, как правило, легче восстанавливаются, это позволяет предположить, что уровни антител к N-белку коррелируют с исходом SARS (39). Согласно нашим результатам сходные механизмы могут присутствовать при инфекции MERS-CoV или SARS-CoV-2.

Во-вторых, мыши, нокаутные по Masp2, показали значительно более легкие симптомы и более короткое течение заболевания в модели пневмонии на мышах, индуцированной ЛПС с бустерной иммунизацией N-белком, что подтвердило вредную роль MASP-2 в этой тяжелой пневмонии. Соответственно, введение антитела к MASP-2 или ингибитора MASP-2 C1INH показало многообещающий терапевтический эффект (Фиг. 3). Улучшенные антитела к MASP-2, которые обладают более высокой аффинностью и нейтрализующей активностью, такие как OMS721 (40) (которые показали многообещающие эффекты в отношении тромботической микроангиопатии), или инъекционное лекарственное средство C1INH, такое как HAEGARDA, могут обеспечить эффективную защиту. Проведение дальнейшей клинической оценки имеет большое значение для лечения пневмонии, индуцированной SARS-CoV-2.

В-третьих, авторы настоящего изобретения наблюдали чрезмерную активацию каскада комплемента в ткани легких умершего пациента, что совпадает с наблюдением в модели на мышах, предварительно инфицированных Ad-SARS N и праймированных ЛПС. Высокий уровень C5a накапливался в сыворотке пациентов с тяжелой формой COVID-19, но не легкой формой. Таким образом, представляется целесообразным, что иммуномодуляция, нацеленная на продукты каскада комплемента, может быть

эффективной для контроля воспаления при заболеваниях, связанных с патогенными коронавирусами. В этом пути C5a является наиболее активным белком комплемента, запускающим воспаление. Основываясь на нашем наблюдении и записи о безопасности в исследовании II фазы при других заболеваниях с использованием Staidson (BDB001) и inflaRx GmbH (IFX-1, произведенный той же сконструированной клеточной линией), рекомбинантное антитело к C5a BDB001 было одобрено NMDA для клинического исследования для лечения пациентов, страдающих COVID-19 тяжелой и критической степени тяжести. По меньшей мере у первых двух пациентов, которые оба были в ухудшающемся состоянии, антитело к C5a показало быстрый и многообещающий эффект, превышающий ожидания врачей-клиницистов. Несмотря на то, что окончательные данные по эффективности не будут выпущены до завершения клинического исследования, стоит ожидать, что антитело к C5a обеспечит новый подход к лечению COVID-19.

Материалы и методы

15 *Клеточная культура и трансфекции*

Клеточную линию 293Т получили из Центра клеточных ресурсов Медицинского колледжа Пекинского Союза. Клетки выращивали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) (Invitrogen), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone), 2 мМ L-глутамина, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки трансфицировали плазмидной ДНК с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя.

Векторы и этикетное мечение белков

Ген N SARS-CoV (номер доступа в GenBank AY274119) амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР из РНК SARS-CoV образцов сыворотки пациентов (прямой праймер: 5'-CGGAATTCCATATGTCTGATAATGGACCCCAA-3'; обратный праймер: 5'-CGGGATCCTTATGCCTGAGTTGAATCAGC-3') и клонировали в Flag-вектор на основе pcDNA3 (Invitrogen), pCMV-Myc (Clontech), pGEX-4T-2 (GE Health Care) и сайты BglII и EcoRI pEGFPC1 (Clontech). Ген N MERS-CoV синтезировали химически (Huaxinrcomm Technology Co., Ltd) и клонировали в Flag-вектор на основе pcDNA3 в сайтах BamHI и EcoRI. Ген N SARSCoV-2 синтезировали химически (General Biosystems (Anhui) Co. Ltd) и клонировали в HA-вектор на основе pcDNA3.1 в сайтах KpnI и XbaI.

Иммунопреципитация и иммуноблоттинг.

Клеточные лизаты готовили в буфере для лизиса (50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 1 мМ дитиотреитола, 10 мМ фторида натрия, 10 мкг/мл апротинина, 10 мкг/мл лейпептина и 10 мкг/мл пепстатина А), содержащем 1% нонидет Р-40. Растворимые белки подвергали иммунопреципитации с использованием агарозы против Flag М2 (Sigma). Затем адсорбаты разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и переносили на переносную мембрану Immobilon-P (Millipore) с помощью полусухого трансблота (Biorad). Мембрану блокировали 5% Western-Blocker (Biorad). Анализ методом иммуноблоттинга выполняли с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) антител к Flag (Sigma), к β -актину (Sigma), к зеленому флуоресцентному белку (GFP) (Clontech), к MASP-2 (Santa Cruz), к C4 α (Santa Cruz), ПХ-конъюгированных антител к Мус (Santa Cruz) и козьих антител к мышинному иммуноглобулину G (IgG) (Amersham/Pharmacia). Комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью хемилюминесценции (GE Health Care).

15 *Очистка N-белка SARS-CoV и MERS-CoV.*

Как описано ранее (1), рЕТ22b-SARS/MERS-CoV N трансформировали в экспрессионный штамм BL21 (DE3). После индукции 1 мМ IPTG в течение 8 ч бактерии собирали центрифугированием и ресуспендировали в буфере А (25 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ) перед ультразвуковой обработкой. Растворимый N-белок в лизате очищали с помощью ионообменной хроматографии с SP-сефарозой Fast Flow (25 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ и 0,35-0,5 М NaCl), с последующей гель-фильтрацией на Superdex 200 (GE Healthcare) и элюированием буфером А. E. coli, трансформированную вектором рЕТ22b, лизировали, как описано выше, и элюат использовали в качестве отрицательного контроля для очищенного N-белка. Очищенный SARS-CoV-2 N-His получали от General Biosystems (Anhui) Co. Ltd.

Очистка и ренатурация MASP-2.

Экспрессию и ренатурацию рекомбинантного белка выполняли, как описано (2, 3). В общих чертах, рЕТ22b-MASP-2 трансформировали в экспрессионный штамм-хозяина BL21 (DE3). После индукции 1 мМ IPTG клетки собирали и обрабатывали ультразвуком. Тельца включения солибилизировали в 6 М GuHCl, 0,1 М Трис-НСl (рН 8,3) и 100 мМ ДТТ при комнатной температуре; затем солибилизированные белки разводили в буферах для повторной укладки, содержащих 50 мМ Трис-НСl, 3 мМ восстановленного глутатиона (Sigma), 1 мМ окисленного глутатиона (Sigma), 5 мМ ЭДТА и 0,5 М аргинина. Затем образцы белка охлаждали до 4°C. Ренатурированный белок диализировали против 20 мМ

Трис, 140 мМ NaCl, pH 7,4 при 4°C, концентрировали с ПЭГ8000, разделяли на алиquotы и хранили при -70°C. Для получения MASP-2 с высокой активностью Flag-меченый MASP-2 экспрессировали в клетках 293Т, осаждали с использованием магнитных гранул против FLAG и элюировали с пептидом Flag (Sigma). Концентрацию MASP-2 оценивали с использованием набора ВСА и анализа методом иммуноблоттинга с очищенным прокариотически экспрессированным MASP-2 в качестве стандартного контроля.

Анализ аутоактивации MASP-2 и расщепления C4.

Очищенный MASP-2 (8 нМ) инкубировали при 37°C в 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl и 2 мМ CaCl₂ с очищенным C4 (Calbiochem), рекомбинированным MBL (Calbiochem), маннаном (Sigma) и N-белком SARS-CoV в концентрациях 50 нМ, 30 нМ, 15 нг/мл и 10 нМ, соответственно. После расщепления проводили электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, и фрагменты C4 и MASP-2 детектировали с помощью анализа методом иммуноблоттинга с использованием антитела к цепи C4 α (Santa Cruz) или антитела к Flag (Sigma).

Анализ осаждения комплемента.

Анализ осаждения C4b выполняли с использованием набора для анализа MBL/MASP-2 человека (Hycult Biotech) (4). В общих чертах, разбавленную сыворотку инкубировали в покрытых маннаном планшетах со связывающим буфером с высокой концентрацией соли в течение ночи при 4°C и удаляли промыванием, затем захватывали комплекс MBL-MASP-2. Очищенный C4 и N-белок добавляли и инкубировали в течение 1,5 ч, и осажденный C4b детектировали в соответствии со стандартными протоколами. Функциональную активность LP и AP оценивали с помощью ИФА, как описано ранее (5). Планшеты Nunc Maxisorb покрывали 10 мкг маннана на лунку в 100 мМ Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9,6) при комнатной температуре в течение ночи. После каждого этапа планшеты трижды промывали ФСБТ (300 мкл/лунку). Остаточные сайты связывания блокировали путем инкубации с 10 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl и 2% ЧСА в течение 2-3 часов при комнатной температуре. Образцы сыворотки разбавляли 1:80 в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,4), содержащем 150 мМ NaCl, 0,5 мМ MgCl₂, 0,05% Tween-20 и 0,1% желатина, с 2 мМ CaCl₂ и N-белком или без них. Все образцы и буферы готовили на льду. Затем планшеты последовательно инкубировали в течение 1 часа при 4°C и в течение 1,5 часа при 37°C с последующей промывкой. Все объемы инкубации составляли 100 мкл. Связывание комплемента детектировали с использованием антител с последующей промывкой. Детектирование C4, активированного C3 и C5b-9 выполняли с использованием антитела к

цепи C4 α (Santa Cruz), антитела к активированному C3 (Santa Cruz) и антитела к C5b-9 (Calbiochem), соответственно. Связывание антител детектировали с использованием ПХ-конъюгированного овечьего антитела к Ig мыши или ослиного антитела к Ig кролика (R&D). Ферментную активность ПХ детектировали с использованием инкубации с ТМВ в течение 30-60 мин при комнатной температуре, и реакцию останавливали 2 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов.

MASP-2: анализ связывания MBL.

10 Связывание MASP-2 с MBL оценивали с помощью ИФА. Как упоминалось выше, планшеты Nunc Maxisorb покрывали 10 мкг маннана на лунку в 100 мМ Na₂CO₃/NaHCO₃ (рН 9,6) при комнатной температуре в течение ночи и блокировали 2% ЧСА. Белок MBL (1 мкг/мл) инкубировали в 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 100 мкг/мл ЧСА и 0,5% TritonX-100 при 4°C в течение 2 часов. Очищенный белок MASP-2 и
 15 N-белок (или контроль) добавляли в лунки в разное время для получения конечных концентраций 0,2 мг/мл и 200 нг/мл, соответственно. Планшеты промывали после 32 часов инкубации при 4°C, и связывание MASP-2 детектировали с использованием антитела к MASP-2, а затем ПХ-конъюгированного кроличьего антитела к Ig козы. Ферментную активность ПХ детектировали с использованием инкубации с ТМВ в течение
 20 30-60 мин при комнатной температуре, и реакцию останавливали 2 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов.

Опсоноцитофагический анализ.

25 Клетки мыши, выделенные из брюшинной полости, промывали и инокулировали со средами RPMI 1640 (10% ФБС) в 96-луночные планшеты в течение 2 часов при 37°C. Сыворотку разбавляли на 0,781%, 1,562%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% и 100% с использованием 1 \times ФСБ, 1 мМ CaCl₂ и 2 мМ MgCl₂. В каждую лунку добавляли разбавленную сыворотку, N-белок SARS-CoV (100 нг/мл) и E. coli (отношение к клеткам
 30 составляло 10:1) и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Элюат из рЕТ22b-трансформированных E. coli использовали в качестве отрицательного контроля для очищенного N-белка, чтобы исключить эффекты из-за бактериальных компонентов, которые могут активировать комплемент. Реакцию останавливали, и клетки фиксировали 10% нейтральным формалином. Осаждение C3c комплемента детектировали с
 35 использованием FITC-меченого антитела к C3c, и окрашенные клетки подсчитывали.

Точки представляют собой средние значения из двух повторных лунок. Планки погрешностей, среднее значение±стандартное отклонение *P<0,05 и **P<0,01 согласно непарному двустороннему t-критерию Стьюдента. Мыши

5 *Создание нулевых по Masp мышей и иммунизация ЛПС*

Группы мышей BALB/c были предоставлены из Центра экспериментальных животных Академии военно-медицинских наук. Мыши MASP-2-/- (KO) и мыши дикого типа (WT) для отрицательного контроля были предоставлены компанией Cyagen Biosciences Inc. Всех мышей содержали в Центре экспериментальных животных Академии военно-медицинских наук (Китай). Мышей (8-10/группу) инфицировали три раза (день 1, 2, 3) 1×10⁸⁻⁹ БОЕ Ad-N/Ad-null (Beijing VAC Biological Technologies) или контрольным физиологическим раствором через хвостовую вену, и ЛПС (5 мг/кг) вводили через хвостовую вену на 5-6 день. Моноклональное антитело к MASP-2 (200 мкг/кг, НВТ), моноклональное антитело к N (200 мкг/кг, Sino Biological) или C1INH (4 мг/кг, Calbiochem) вводили путем инъекции через хвостовую вену за 30 минут до инъекции ЛПС.

Иммуногистохимия

Посмертное вскрытие четырех пациентов, скончавшихся в больнице Хуошеншань, было проведено д-ром Сюйву Бянем (Xiwu Bian) с одобрения Комитета по этике больницы и члена семьи погибшего. Подробные результаты будут опубликованы в другом месте. Фиксированные параформальдегидом ткани легких использовали для приготовления парафиновых срезов ткани, и иммуногистохимическое окрашивание антителами к MBL (Santa Cruz), MASP-2 (Santa Cruz), цепи C4 α (Santa Cruz), C3 (Santa Cruz) или C5b-9 (Calbiochem) проводили, как описано выше.

Детектирование C5a у пациентов, страдающих COVID-19.

Сыворотки пациентов, страдающих COVID-19 легкой или тяжелой степени тяжести, собирали с одобрения Комитета по этике больницы. Пациентов с тяжелой степенью тяжести определяли, как имеющих лихорадку или подозрение на респираторную инфекцию, а также одно из частоты дыхания >30 вдохов/мин, тяжелого респираторного дистресса или SpO₂<90% на воздухе в помещении. Пациенты с пневмонией и отсутствием признаков тяжелой пневмонии определяются как легкие случаи. Анализировали сыворотки от 10 пациентов с легкой степенью тяжести (5 мужчин, 5 женщин) со средним возрастом 56±12,1 года и средним сроком болезни 26,3±9,1 дня. Сыворотки от здоровых людей для

физических целей собирали в клинической лаборатории. Уровень С5а в сыворотке детектировали с помощью ИФА в формате «сэндвич» с двумя антителами (R&D).

Терапия антителом к С5а.

- 5 Антитело мыши/человека (IgG4) против С5а человека (инъекция Vdb-001) было предоставлено компанией Staidson Biopharmaceutical Co., Ltd, и было изготовлено в соответствии с протоколом Надлежащей производственной практики. Инъекция была одобрена Национальным управлением по изделиям медицинского назначения (NMDA) Китая для клинического исследования фазы I у здоровых субъектов в 2019 г. После
- 10 вспышки пневмонии, индуцированной коронавирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), антитело было одобрено NMDA для клинического исследования фазы II для лечения COVID-19 7 февраля 2020 года (2020L00003). Введение антитела человеку также было одобрено Комитетом по этике больницы Хуошеншань Уханя. 300 мг антитела к С5а в 250 мл физиологического раствора вводили в/в в день 1, 2, 3, 5, 7, 9 и 11. Регулярно определяли
- 15 содержание газа в артериальной крови (ABG), уровень С-реактивного белка (СРБ), рутинный анализ крови (RT крови) и функцию печени. SaO₂, артериальное давление, ЧСС контролировали по мере необходимости.

Источники

- 20 1. World Health Organization Multicentre Collaborative Network for Severe Acute Respiratory Syndrome Diagnosis, *Lancet* 361, 1730 (May 17, 2003).
2. N. Lee et al., *N. Engl. J. Med.* 348, 1986 (2003).
3. J. F. Chan et al., *Clin Microbiol Rev* 28, 465 (Apr, 2015).
4. C. Huang et al., *The Lancet*, (2020).
- 25 5. R. L. Graham, E. F. Donaldson, R. S. Baric, *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836 (Dec, 2013).
6. P. A. Rota et al., *Science* 300, 1394 (May 30, 2003).
7. J. F. Chan et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 465 (Apr, 2015).
8. P. Zhou et al., *Nature*, (2020).
9. M. Surjit et al., *Journal of virology* 79, 11476 (Sep, 2005).
- 30 10. F. Yasui et al., *J. Immunol.* 181, 6337 (Nov 1, 2008).
11. D. Deming et al., *PLoS Med.* 3, e525 (Dec, 2006).
12. S. Sun et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 221 (Aug, 2013).
13. J. Zhou et al., *J. Infect. Dis.* 209, 1331 (May 1, 2014).
14. M. Wills-- - Karp, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 247 (Jul, 2007).
- 35 15. K. Takahashi, W. E. Ip, I. C. Michelow, R. A. Ezekowitz, *Curr. Opin. Immunol.* 18, 16 (Feb, 2006).
16. R. Wallis, *Immunobiology* 212, 289 (2007).
17. W. K. Ip et al., *J. Infect. Dis.* 191, 1697 (May 15, 2005).
18. Y. Zhou et al., *Journal of virology* 84, 8753 (Sep, 2010).
- 40 19. J. H. Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17039 (2004).
20. R. T. Pang et al., *Clin. Chem.* 52, 421 (Mar, 2006).
21. R. Wang, H. Xiao, R. Guo, Y. Li, B. Shen, *Emerg. Microbes Infect.* 4, e28 (May, 2015).

22. J. L. Liu, C. Cao, Q. J. Ma, *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 25, 777 (Sep, 2009).
23. S. V. Petersen, S. Thiel, L. Jensen, R. Steffensen, J. C. Jensenius, *J. Immunol. Methods* 257, 107 (Nov 1, 2001).
24. X. Y. Che et al., *Emerg Infect Dis* 10, 1947 (Nov, 2004).
- 5 25. P. Gal et al., *J Biol Chem* 280, 33435 (Sep 30, 2005).
26. T. Gao, H. Zhao, X. Liu, C. Cao, *Letters in Biotechnology* 22, 806 (2011).
27. L. Beinrohr, J. Dobo, P. Zavodszky, P. Gal, *Trends Mol. Med.* 14, 511 (Dec, 2008).
28. S. V. Petersen, S. Thiel, L. Jensen, R. Steffensen, J. C. Jensenius, *J Immunol Methods* 257, 107 (Nov 1, 2001).
- 10 29. N. Rawal, R. Rajagopalan, V. P. Salvi, *J. Biol. Chem.* 283, 7853 (Mar 21, 2008).
30. M. Okroj, E. Holmquist, B. C. King, A. M. Blom, *PLoS One* 7, e47245 (2012).
31. D. S. Cole, B. P. Morgan, *Clin. Sci. (Lond)* 104, 455 (May, 2003).
32. M. Devyatyarova-- - Johnson et al., *Infect. Immun.* 68, 3894 (Jul, 2000).
33. J. R. Dunkelberger, W. C. Song, *Cell Res.* 20, 34 (Jan, 2010).
- 15 34. D. K. Imagawa, N. E. Osifchin, W. A. Paznekas, M. L. Shin, M. M. Mayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6647 (Nov, 1983).
35. E. Sanchez-- - Galan et al., *Cardiovasc. Res.* 81, 216 (Jan 1, 2009).
36. Y. Ren et al., *Proteomics* 4, 3477 (Nov, 2004).
37. C. Drosten et al., *N. Engl. J. Med.* 348, 1967 (May 15, 2003).
- 20 38. Y. Ami et al., *Microbiol. Immunol.* 52, 118 (Feb, 2008).
39. L. Zhang et al., *J Med Virol* 78, 1 (Jan, 2006).
40. W. J. Schwaeble et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 7523 (May 3, 2011).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор активности C5a для применения при лечении медицинского состояния, вызванного или ассоциированного с инфекцией коронавирусом, при этом
5 указанное медицинское состояние предпочтительно представляет собой (i) пневмонию и/или (ii) лихорадку.
2. Ингибитор активности C5a для применения при уменьшении воспалительного
10 ответа у субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.
3. Ингибитор активности C5a для применения при улучшении функции органа, в частности, функции легких и/или функции печени, у субъекта, страдающего
коронавирусной инфекцией.
- 15 4. Ингибитор активности C5a для применения по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный коронавирус выбран из группы, включающей SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.
5. Ингибитор C5a для применения по любому из предшествующих пунктов,
20 отличающийся тем, что указанный субъект страдает SARS, MERS или COVID-19.
6. Ингибитор C5a для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное лечение приводит к одному или более из
следующего:
25
 - уменьшению уровня C-реактивного белка;
 - уменьшению лихорадки;
 - увеличению количества лимфоцитов в крови;
 - уменьшению уровня АЛТ/АСТ; и/или
 - увеличению кислородного индекса (PaO_2/FiO_2).
- 30 7. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор активности C5a:
35
 - снижает концентрацию C5;
 - ингибирует расщепление C5 на C5a и C5b;
 - снижает концентрацию C5a;

- ингибирует связывание C5a с рецептором C5a;
 - снижает концентрацию рецептора C5a; и/или
 - ингибирует активность рецептора C5a.
- 5 8. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд, который специфично связывается с C5 или с C5a, или с рецептором C5a.
- 10 9. Ингибитор активности C5a для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный белковый лиганд выбран из группы, состоящей из
- (i) антител или их антигенсвязывающих фрагментов,
 - (iii) антителоподобных белков,
 - 15 (iv) ингибирующих вариантов C5a,
 - (v) ингибирующих вариантов рецептора C5a,
 - (vi) белков, действующих на путь комплемента; и
 - (vii) пептидов.
- 20 10. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, который специфично связывается с C5 или с C5a, или с рецептором C5a.
- 25 11. Соединение для применения по п. 10, отличающееся тем, что указанный олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из ДНК-аптамеров, D-РНК-аптамеров и L-РНК-аптамеров.
- 30 12. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a.
- 35 13. Соединение для применения по п. 12, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из антисмысловой ДНК, антисмысловой РНК, миРНК и микроРНК.

14. Соединение для применения по любому из пп. 7-13, отличающееся тем, что указанный рецептор C5a представляет собой C5aR и/или C5L2.
- 5 15. Соединение для применения по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из:
- 10 (a) MEDI-7814, ALXN-1007 или NOX-D21, или их антигенсвязывающего фрагмента;
- (b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с одним из антител, указанных в (a), за связывание с C5a;
- 15 (c) Экулизумаба, ALXN1210, ALXN5500, или LFG316, или их антигенсвязывающего фрагмента;
- (d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с одним из антител, указанных в (c), за связывание с C5;
- 20 (e) Коверсина (Coversin) или RA101495;
- (f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или белка или макроциклического пептида, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или белок, или макроциклический пептид конкурируют с одним из белков или пептидов, указанных в (e), за связывание с C5;
- 25 (g) Зимуры (Zimura);
- (h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или аптамера, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или аптамер конкурируют с зимурой за связывание с C5;
- 30 (i) АМУ-201 или Мирокоцепта;
- (j) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или белок конкурируют с одним из белков, указанных под (i), за связывание с C3b;
- 35 (k) Бикациомаба;
- (l) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с бикациомабом за связывание с фактором В;
- (m) Лампализумаба;

- (n) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с лампализумабом за связывание с фактором D;
- (o) ALN-CC5;
- 5 (p) Авакопана или соединения согласно Формуле II или Формуле III; или PMX-53, или соединения согласно Формуле IV;
- (q) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с авакопаном или PMX-53 за связывание с C5aR;
- 10 (r) клона S5/1 или клона 7H110, или их антигенсвязывающего фрагмента; и
- (s) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с одним из антител, указанных в (r), за связывание с C5aR.
- 15 16. Ингибитор C5a для применения по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный ингибитор C5a специфично связывается с конформационным эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) и SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) C5a человека, и
- 20 причем указанный ингибитор C5a связывается с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 и с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 3.
- 25 17. Ингибитор C5a для применения по любому из пп. 1-9 или 16, отличающийся тем, что указанный ингибитор C5a представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
- причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
- (i) последовательность CDR3 тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 6; или
- (ii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7;
- 30 при этом указанная последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

18. Ингибитор C5a для применения по любому из пп. 1-9, 16 или 17, отличающийся тем, что указанная связывающая группа представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат
- 5 (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8; или
(iv) последовательность CDR3 легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9;
при этом указанная последовательность CDR3 легкой цепи необязательно
включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные
аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3
10 добавления аминокислот.
19. Ингибитор C5a для применения по любому из пп. 1-9 или 16-18, отличающийся тем, что указанная связывающая группа представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по
15 меньшей мере одну из следующих последовательностей:
- (v) последовательность CDR2 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 10;
(vi) последовательность CDR2 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 11;
(vii) последовательность CDR2 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 12;
20 (viii) последовательность CDR2 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 13;
(ix) последовательность CDR1 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 14;
(x) последовательность CDR1 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 15;
(xi) последовательность CDR1 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 16; или
(xii) последовательность CDR1 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 17;
- 25 при этом указанная последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно
содержит 1, 2 или 3 замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены
аминокислот, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 вставки
аминокислот;
при этом указанная последовательность CDR2 легкой цепи необязательно
30 содержит 1, 2 или 3 замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены
аминокислот, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 вставки
аминокислот;
при этом указанная последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно
включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные

аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

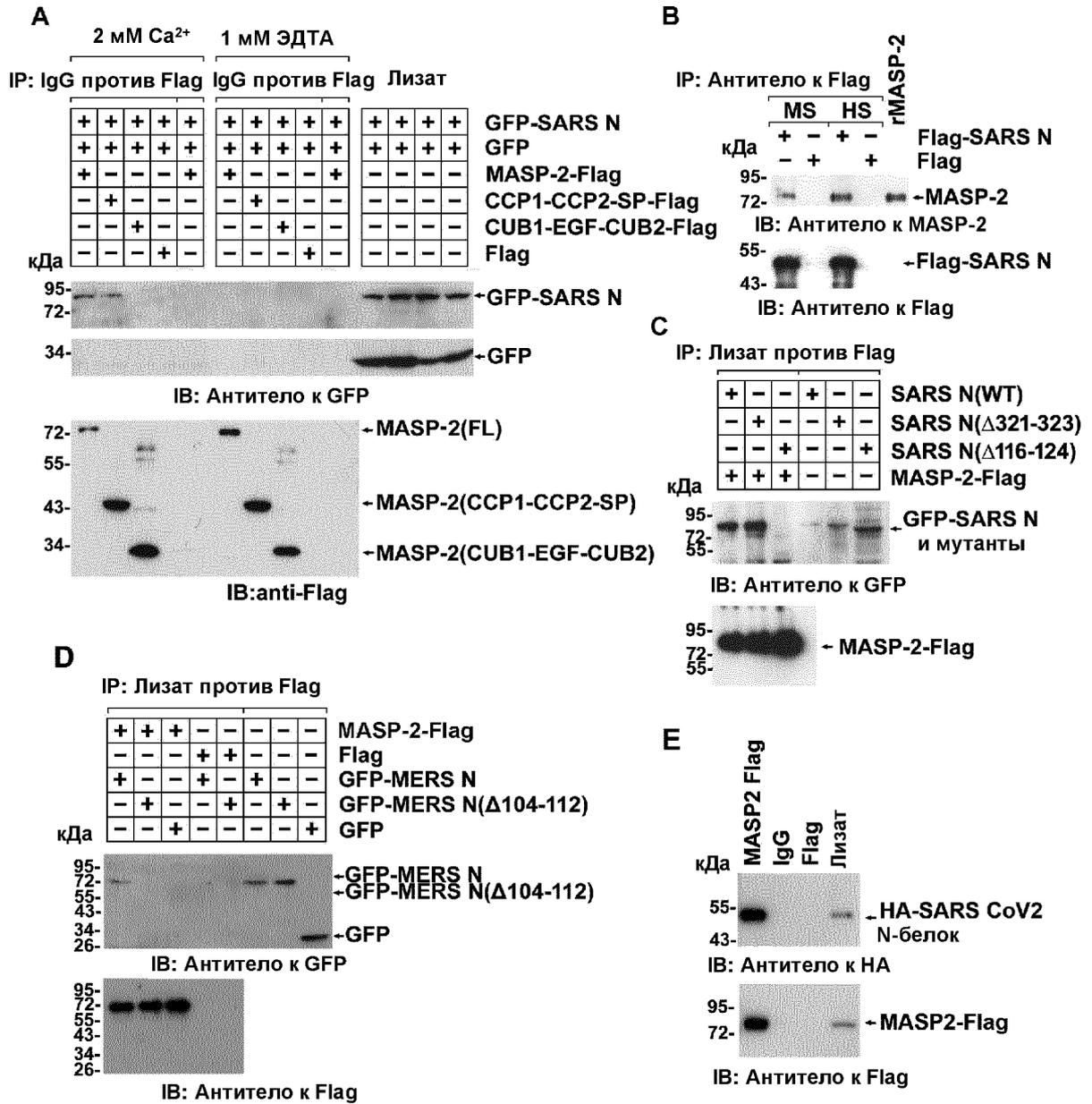
при этом указанная последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

20. Ингибитор C5a для применения по любому из пп. 16-19, отличающийся тем, что указанная связывающая группа представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

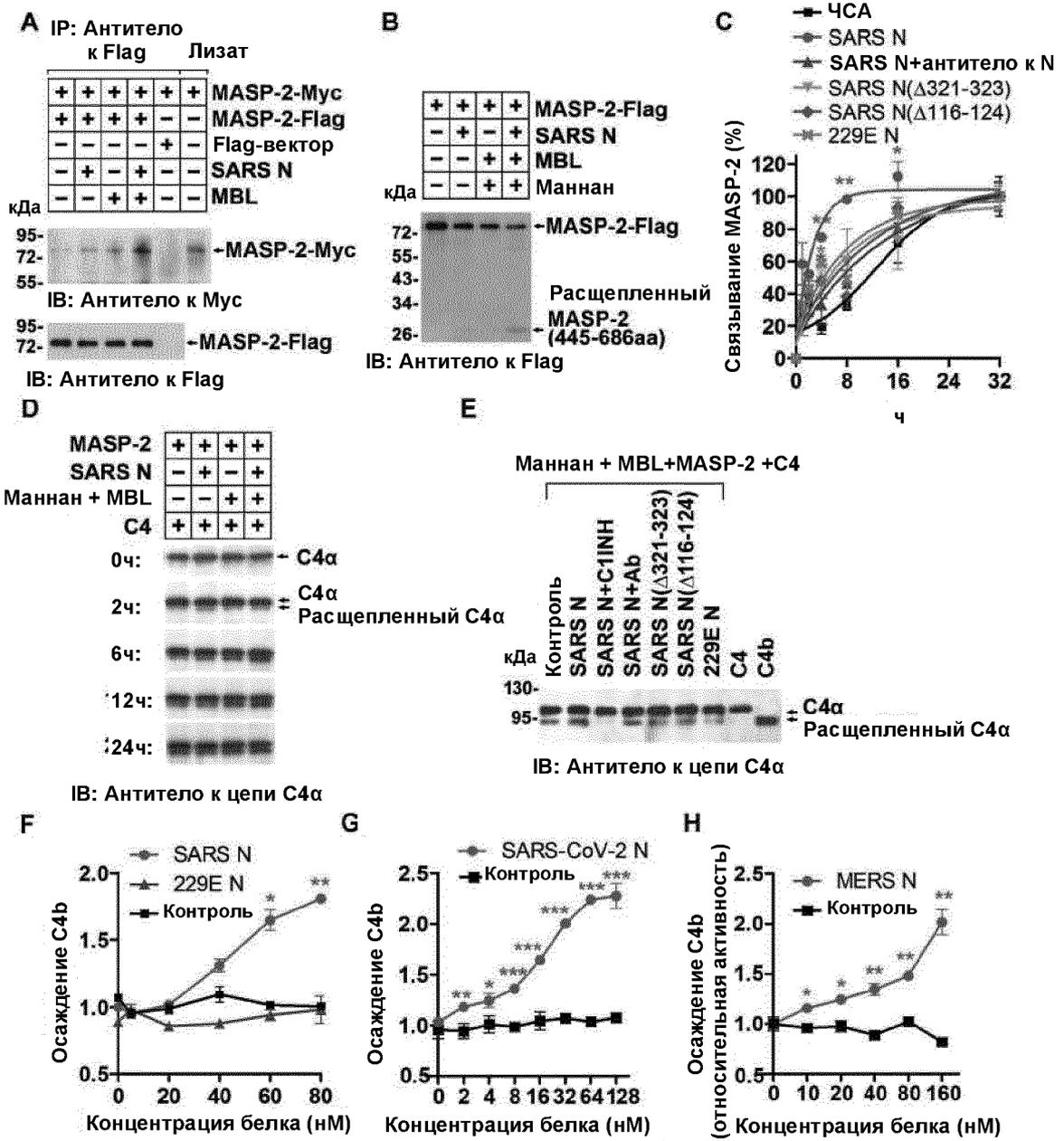
(i) переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 34 и последовательность переменной области легкой цепи с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 35 или варианты, имеющие по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 34 и 35, которые содержат аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой и тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14 и 16 или их варианты как указано в пп. 15-18;

(ii) последовательность переменной области тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 и последовательность переменной области легкой цепи с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 37 или варианты, имеющие по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 36 и 37, которые содержат аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой и тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15 и 17 или их варианты как указано в пп. 15-18.

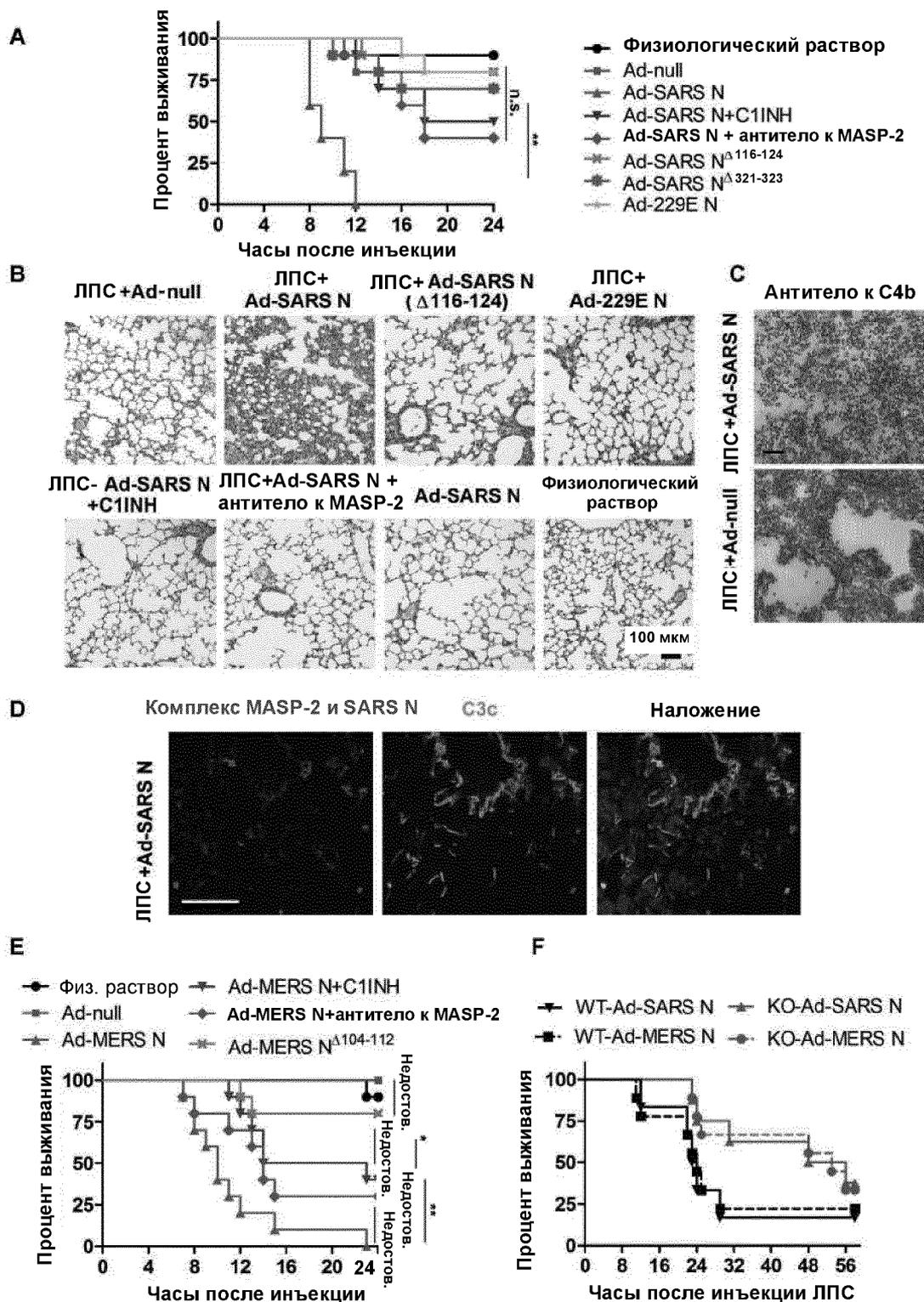
Фигура 1



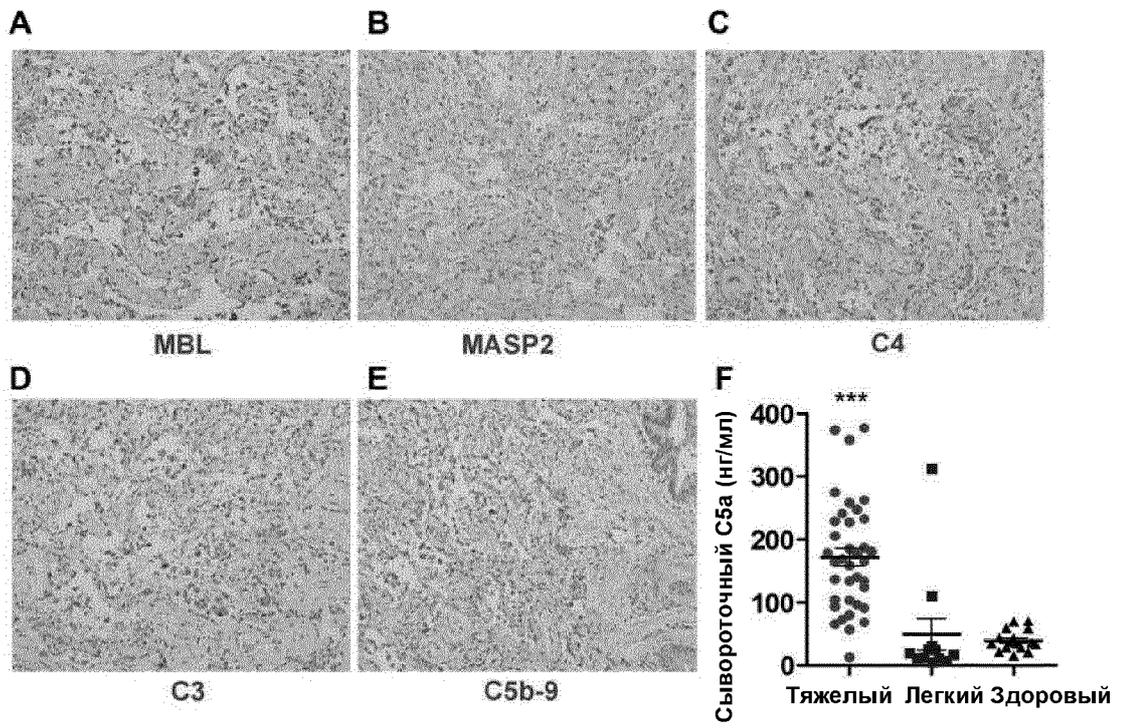
Фигура 2



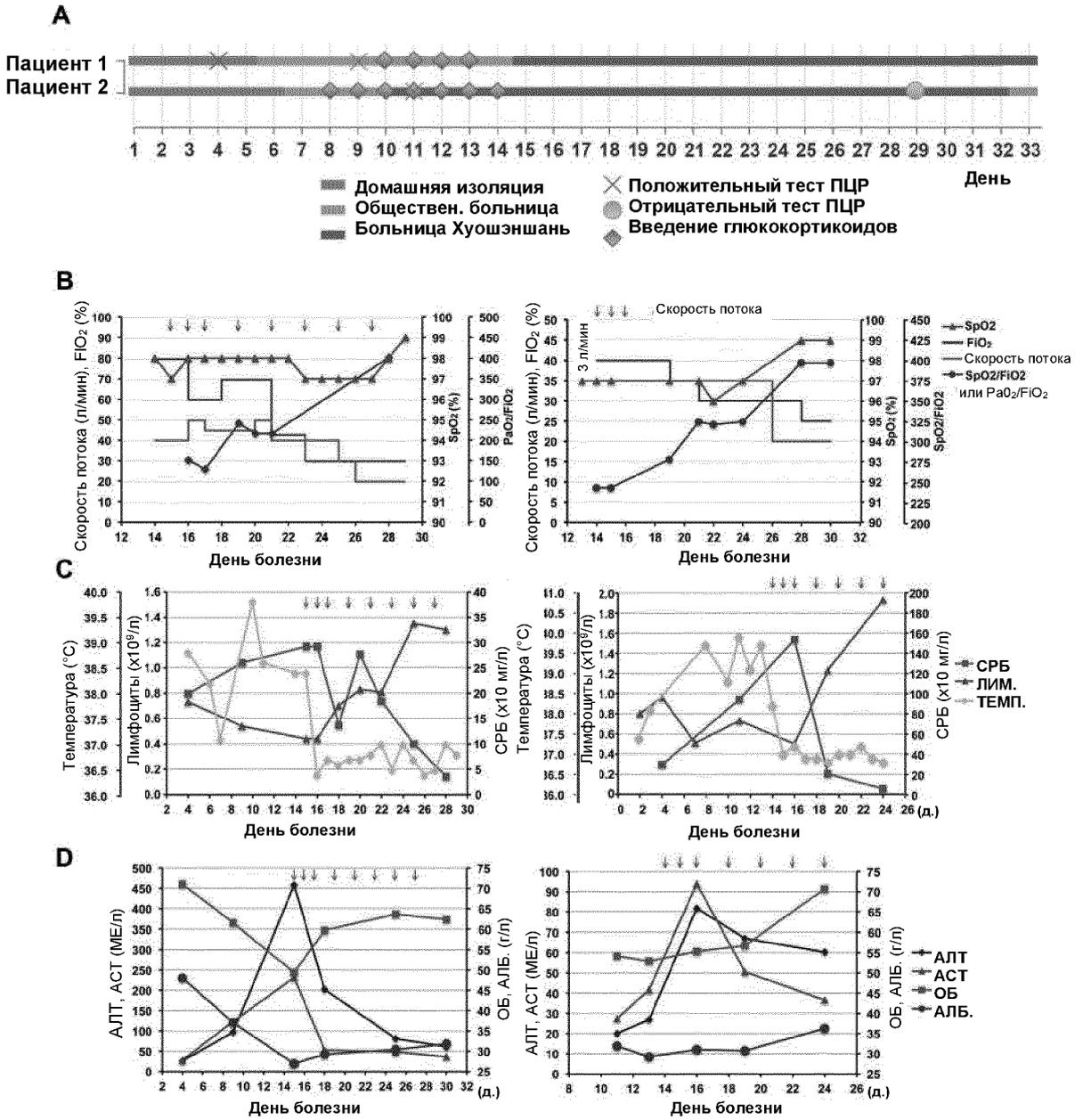
Фигура 3



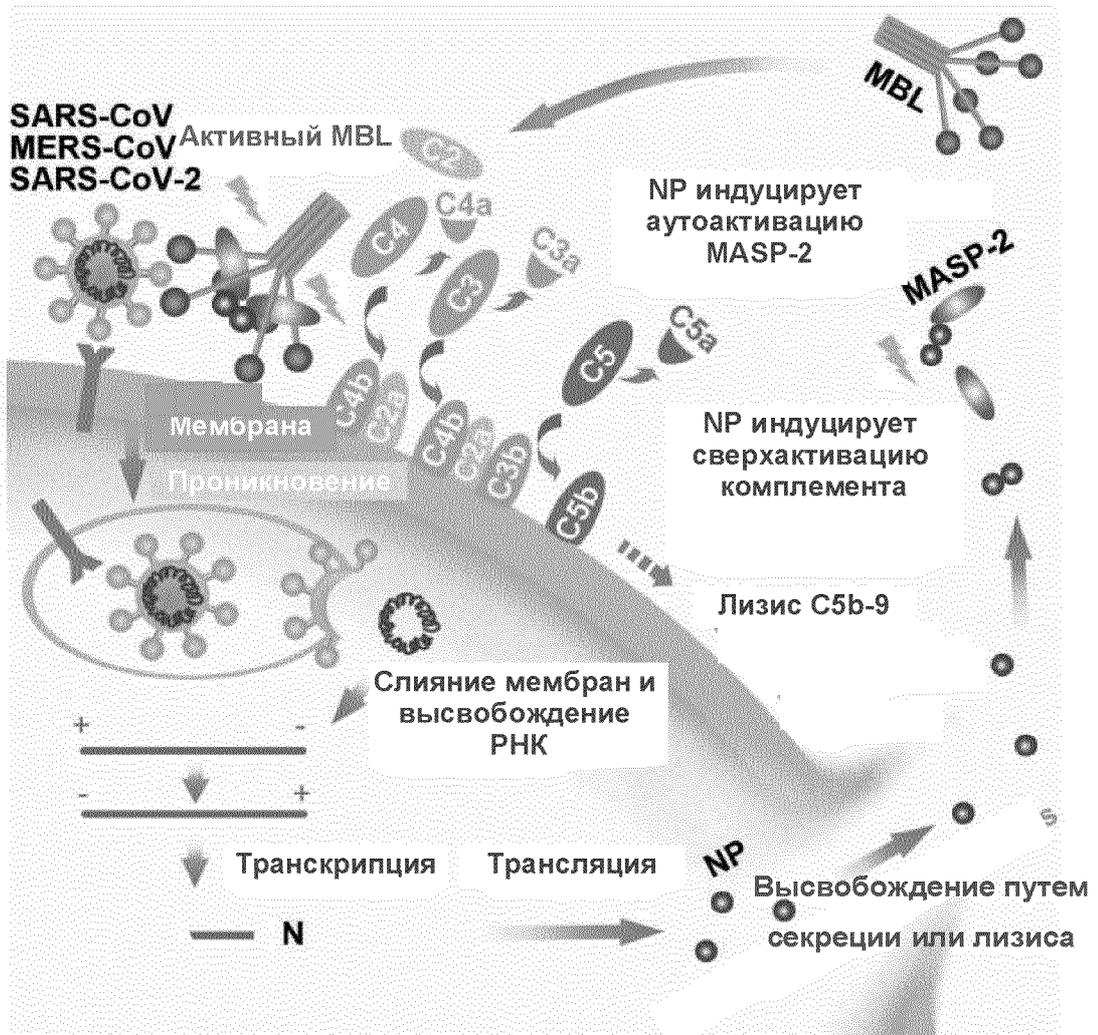
Фигура 4



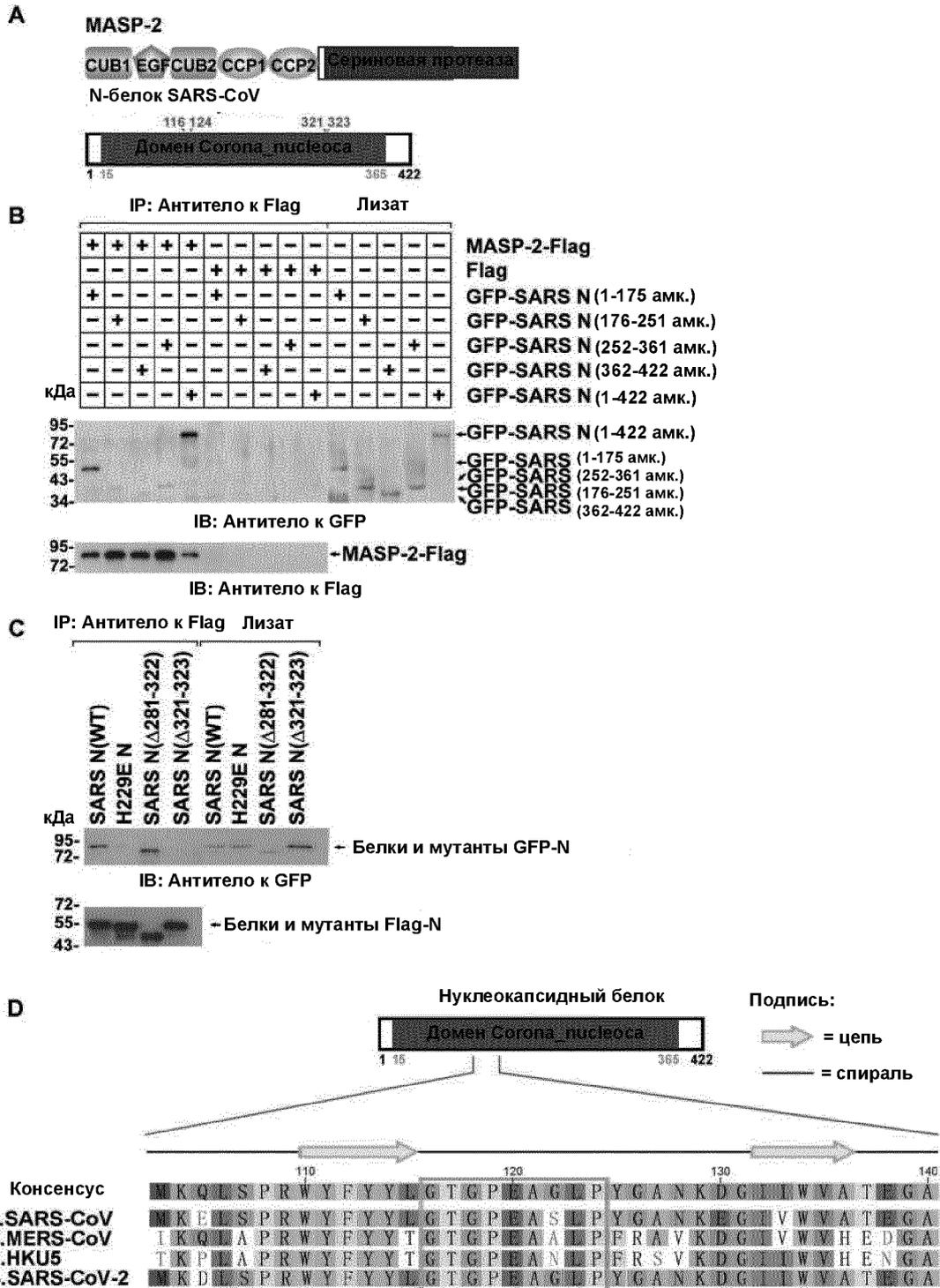
Фигура 5



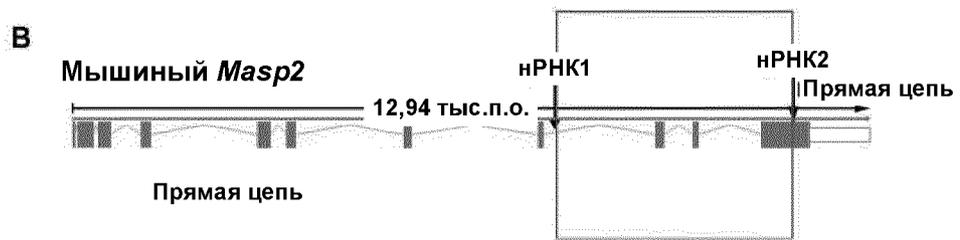
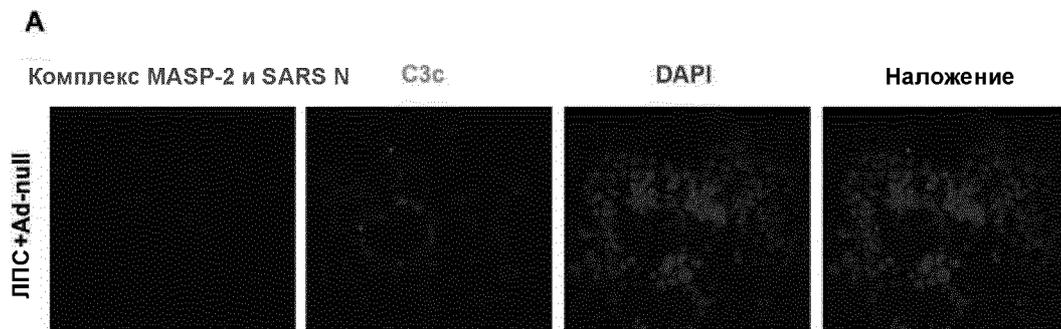
Фигура 6



Фигура 7



Фигура 9



Фигура 10

