

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042534**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.22

(21) Номер заявки
201891132

(22) Дата подачи заявки
2016.11.09

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СОСТОЯНИЙ, СВЯЗАННЫХ С MASP-2 ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИЕЙ КОМПЛЕМЕНТА

(31) **62/252,814; 62/406,726**

(32) **2015.11.09; 2016.10.11**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/061113**

(87) **WO 2017/083371 2017.05.18**

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

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

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

(56) **US-AA-2015166675**

"FDA Grants Orphan Drug Designation To Omeros' OMS721 For Complement-Mediated Thrombotic Microangiopathies", Outsourced Pharma, 18 December 2013 (18.12.2013), P. 1-2, Retrieved from the Internet <<http://www.outsourcedpharma.com/doc/fda-grants-orphan-drug-designation-to-omeros-oms-for-complement-0001>> on 29 December 2016 (29.12.2016), entire document

US-A1-20130344073

BARBOUR et al.: "Thrombotic microangiopathy and associated renal disorders", Nephrol Dial Transplant, 01 July 2012 (01.07.2012), Vol. 27, P. 2673-2685, entire document

FRÉMEAUX-BACCHI et al.: "The emerging role of complement inhibitors in transplantation", Kidney International, 16 September 2015 (16.09.2015), Vol. 88, P. 967-973, entire document

(57) В одном аспекте изобретение предлагает способы ингибирования эффектов MASP-2 зависимой активации комплемента у человека, страдающего от тромботической микроангиопатии (ТМА), связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Способы включают стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, количества MASP-2 ингибирующего средства, которое эффективно ингибирует MASP-2 зависимую активацию комплемента.

B1**042534****042534****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/406726, зарегистрированной 11 октября 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/252814, зарегистрированной 9 ноября 2015 г., содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

Заявление по поводу перечня последовательностей

Перечень последовательностей, относящихся к этому патенту, предоставлен не в форме бумажной копии, а в виде файла в текстовом формате, и, поэтому, содержание этого файла включено в настоящее изобретение путем ссылки на него. Файл в текстовом формате, содержащий перечень последовательностей, имеет следующее название: MP_1_0248_PCT_Sequence_Listing_as_Filed_20161109.txt. Текстовый файл размером 115 килобайт, созданный 8 ноября 2016 г., предоставлен на сайт для электронной регистрации заявок EFS-Web вместе с описанием патентной заявки.

Уровень техники

Система комплемента обеспечивает на начальной стадии механизм инициирования, амплификации и направления иммунного ответа на микробную инфекцию и другие острые поражения (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York) у людей и других позвоночных. Активация комплемента обеспечивает первый важный защитный барьер от потенциальных патогенов, но активность комплемента, которая промотирует защитный иммунный ответ, может также представлять потенциальную угрозу для организма-хозяина (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417 431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* 24:219 228, 1994). Например, продукты протеолиза C3 и C5 вызывают рекрутмент и активацию нейтрофилов. Нейтрофилы необходимы для защиты организма-хозяина, но активированные нейтрофилы действуют неизбирательно при высвобождении ими деструктивных ферментов и могут вызвать повреждение органа. Кроме того, активация комплемента может приводить к отложению литических компонентов комплемента на расположенных рядом клетках организма-хозяина, а также на микробах-мишенях, что в результате вызывает лизис клеток организма-хозяина.

Система комплемента также вовлечена в патогенез различных острых и хронических болезненных состояний, включая инфаркт миокарда, инсульт, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), реперфузионное повреждение, септический шок, повышенную проницаемость капилляров после термических ожогов, воспаление после операции в условиях искусственного кровообращения, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, тяжелую миастению и болезнь Альцгеймера. Почти при всех этих состояниях, сам комплемент не является причиной их возникновения, но он представляет собой один из нескольких факторов, участвующих в патогенезе. Тем не менее, активация комплемента может являться основным патофизиологическим механизмом и служить эффективной точкой клинического контроля при многих из этих болезненных состояний. Возрастающее признание той важной роли, которую играет комплемент в повреждении тканей при различных болезненных состояниях, указывает на потребность в лекарственных средствах, эффективно ингибирующих комплемент. В настоящее время, единственным лекарственным средством, которое таргетированно на комплемент и разрешено для применения на людях, является экулизумаб (Soliris®), представляющий собой антитело против C5. Кроме того, C5 является одной из нескольких эффекторных молекул, действующих на последующих стадиях реакции системы комплемента, и блокада C5 не приводит к ингибированию активации системы комплемента. Поэтому, ингибитор стадий инициирования активации комплемента может давать существенные преимущества по сравнению с ингибитором последующих стадий реакции системы комплемента.

В настоящее время является общепризнанным, что система комплемента может быть активирована тремя различными путями: по классическому пути, по лектиновому пути и по альтернативному пути. Классический путь обычно запускается комплексом, состоящим из антител организма-хозяина, связанных с инородной частицей (то есть с антигеном), и, соответственно, для генерирования специфического гуморального иммунного ответа требуется предварительное воздействие антигена. Так как активация классического пути зависит от предварительного адаптивного иммунного ответа организма-хозяина, то такой классический путь является частью приобретенной иммунной системы. В отличие от этого, лектиновый и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунного ответа и являются частью врожденной иммунной системы.

Активация системы комплемента приводит к последующей активации зимогенов серин-протеазных факторов. Первой стадией активации классического пути является связывание молекулы специфического распознавания C1q с антигеном, связанным с молекулами IgG и IgM. C1q ассоциирована с серин-протеазными проферментами C1r и C1s в форме комплекса, обозначаемого C1. После связывания C1q с иммунным комплексом, аутопротеолитическое расщепление Arg-Ile-сайта C1r сопровождается C1r-опосредуемым расщеплением и активацией C1s, что придает ему способность расщеплять C4 и C2. C4 расщепляется на два фрагмента, обозначаемые C4a и C4b, и, аналогично, C2 расщепляется на компоненты C2a и C2b. Фрагменты C4b могут образовывать ковалентные связи с расположенными рядом гидроксильными группами или аминокислотными группами и генерировать C3-конвертазу (C4b2a) в результате некова-

лентного взаимодействия с фрагментом C2a активированной C2. C3-конвертаза (C4b2a) активирует C3 путем протеолитического расщепления на субкомпоненты C3a и C3b, что приводит к образованию C5-конвертазы (C4b2a3b), которая в результате расщепления C5 образует мембраноатакующий комплекс (C5b в сочетании с C6, C7, C8 и C9 называют также "MAC"), который может разрушать клеточные мембраны, вызывая клеточный лизис. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) ковалентно осаждаются на поверхностях чужеродных мишеней, которые распознаются рецепторами комплемента на множестве фагоцитов.

Независимо от этого, первой стадией активации системы комплемента по лектиновому пути также является связывание молекул специфического распознавания, после которой происходит активация ассоциированных серин-протеазных проферментов. Однако, вместо связывания иммунного комплекса с помощью C1q, молекулы распознавания в лектиновом пути включают группу углеводсвязывающих белков (маннан-связывающий лектин (MBL), Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и лектин С-типа CL-11), которые в совокупности называют "лектинами". См. публикации J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)). См. также публикации J. Luet et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al., *J. Immunol.* 185 (10):6096-6104 (2010).

В публикации Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, (1987) было впервые продемонстрировано, что MBL, подобно C1q, может активировать систему комплемента C4-зависимым способом после связывания с эритроцитами, покрытыми дрожжевым маннаном. MBL, представитель семейства белков кол-лектинов, представляет собой кальций-зависимый лектин, который связывается с углеводами по 3- и 4-гидроксигруппам, ориентированным в экваториальной плоскости пиранозного кольца. Поэтому, основными лигандами для MBL являются D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, а углеводы, не удовлетворяющие этому стерическому требованию, практически не обнаруживают аффинности по отношению к MBL (Weis, W.I., et al., *Nature* 360:127-134, 1992). Взаимодействие между MBL и одновалентными сахарами является очень слабым, и их константы диссоциации обычно находятся в диапазоне однозначных миллимолярных значений. MBL достигает прочного специфического связывания с гликановыми лигандами вследствие авидитета, то есть вследствие одновременного взаимодействия с множеством моносакхаридных остатков, расположенных в непосредственной близости друг от друга (Lee, R.T., et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299: 129-136, 1992). MBL распознает углеводные фрагменты, которые обычно декорируют поверхность микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи, паразиты и некоторые вирусы. В отличие от этого, MBL не распознает D-галактозу и сиаловую кислоту, предконечные и конечные сахара, которые обычно декорируют "зрелый" комплекс гликоконъюгатов, присутствующих на гликопротеинах плазмы и клеточной поверхности у млекопитающих. Считают, что такая специфичность связывания промотирует распознавание "чужеродных" поверхностей и способствует защите от "самоактивации". Однако MBL не связывается с высокой аффинностью с кластерами "предшественников" гликанов с высоким содержанием маннозы на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, секвестрированных в эндоплазматическом ретикулуме и в аппарате Гольджи клеток млекопитающих (Maynard, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, 1982). Поэтому поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для активации по лектиновому пути посредством связывания с MBL.

Фиколины содержат лектиновый домен, отличающийся от лектинового домена MBL, который называют фибриноген-подобным доменом. Фиколины связывают остатки Са⁺⁺-независимым способом. У людей идентифицированы три вида фиколинов (L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин). Два сывороточных фиколина, L-фиколин и Н-фиколин, и тот, и другой, обладают специфичностью в отношении N-ацетил-D-глюкозамина, но Н-фиколин также связывает и N-ацетил-D-галактозамин. Различия в специфичности L-фиколина, Н-фиколина, CL-11 и MBL по отношению к сахарам означают, что разные лектины могут быть комплементарными и по-разному таргетированными, хотя и частично дублирующими друг друга, гликоконъюгатами. Эта концепция подтверждается недавно опубликованными данными научных исследований о том, что из всех известных лектинов, участвующих в лектиновом пути, только L-фиколин специфически связывается с липотейхоевой кислотой, с гликоконъюгатом клеточной оболочки, обнаруживаемом на всех грамположительных бактериях (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, 2004). Аминокислотные последовательности коллектинов (то есть MBL) и фиколинов не имеют какого-либо существенного сходства. Однако эти две группы белков имеют аналогичные доменные организации и, подобно C1q, формируются в олигомерные структуры, которые максимизируют их способность к мультисайтовому связыванию.

Концентрации MBL в сыворотке крови здоровых людей характеризуется высокой вариабельностью и генетически регулируются полиморфизмом/мутациями как в промоторных, так и в кодирующих областях гена MBL. Уровень экспрессии MBL как белка острой фазы дополнительно повышающе регулируется в процессе воспаления. L-фиколин присутствует в сыворотке в концентрациях, аналогичных концентрациям MBL. Поэтому, эффективность L-фиколиновой ветви лектинового пути, в принципе, сравнима с эффективностью MBL-ветви. MBL и фиколины могут также действовать как опсонины, что позволяет фагоцитам быть таргетированными на MBL- и фиколин-декорированные поверхности (см. Jack et al., *J.*

Leukoc Biol., 77(3):328-36 (2004); Matsushita and Fujita, Immunobiology, 205 (4-5):490-7 (2002); Aoyagi et al., J. Immunol. 174(1):418-25 (2005)). Такая опсонизация требует взаимодействия этих белков с рецепторами фагоцитов (Kuhlman, M., et al., J. Exp. Med. 169:1733, 1989; Matsushita, M., et al., J. Biol. Chem. 271:2448-54, 1996), идентичность которых пока еще не установлена.

MBL человека формирует специфическое и высокоаффинное взаимодействие посредством его коллаген-подобного домена с уникальными C1r/C1s-подобными сериновыми протеазами, называемыми MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP). В настоящее время описаны три MASP. Первым был идентифицирован один фермент "MASP", который был охарактеризован как фермент, ответственный за иницирование каскада реакций комплемента (то есть реакций расщепления C2 и C4) (Matsushita M & Fujita T., J. Exp Med 176(6):1497-1502 (1992), Ji, Y.H., et al., J. Immunol. 150:571-578, 1993). Затем было обнаружено, что активность MASP фактически представляет собой активность смеси двух протеаз MASP-1 и MASP-2 (Thiel, S., et al., Nature 386:506-510, 1997). Однако было показано, что для активации комплемента достаточно и одного комплекса MBL-MASP-2 (Vorup-Jensen, T., et al., J. Immunol. 165:2093-2100, 2000). Кроме того, только MASP-2 расщепляла с высокой степенью превращения C2 и C4 (Ambros, G., et al., J. Immunol. 170: 1374-1382, 2003). Следовательно, MASP-2 представляет собой протеазу, ответственную за активацию C4 и C2 для генерирования C3-конвертазы, C4b2a. Это существенно отличается от комплекса C1 классического пути, где координированное действие двух специфических сериновых протеаз (C1r и C1s) приводит к активации системы комплемента. Кроме того, была выделена третья новая протеаза MASP-3 (Dahl, M.R., et al., Immunity 15: 127-35, 2001). MASP-1 и MASP-3 представляют собой альтернативно сплайсированные продукты одного и того же гена.

MASP имеют те же самые доменные организации, что и доменные организации в случае C1r C1s, ферментных компонентов комплекса C1 (Sim, R.B., et al., Biochem. Soc. Trans. 25:545, 2000). Эти домены включают N-терминальный домен C1r/C1s/фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) морского ежа/костного морфогенетического белка (CUB); домен, подобный эпидермальному фактору роста; второй домен CUB; тандем доменов регуляторных белков комплемента и домен сериновой протеазы. Как и в протеазах C1, активация MASP-2 осуществляется в результате разрыва связи Arg-Ile, расположенной рядом с доменом сериновой протеазы, что приводит к расщеплению фермента на связанные с дисульфидом цепи A и B, где последняя из двух цепей состоит из домена сериновой протеазы.

MBL может также ассоциироваться с альтернативно сплайсированной формой MASP-2, известной как MBL-ассоциированный белок размером 19 кДа (Map19) или малый MBL-ассоциированный белок (sMAP), который не обладает каталитической активностью MASP-2 (Stover, J. Immunol. 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-863, (1999)). Map19 включает первые два домена MASP-2, за которыми следует дополнительная последовательность из четырех уникальных аминокислот. Гены MASP-1 и MASP-2 располагаются, соответственно, на хромосомах 3 и 1 человека (Schwaebler, W., et al., Immunobiology 205:455-466, 2002).

Ряд полученных данных свидетельствуют о том, что существуют различные комплексы MBL-MASP, и что большая фракция MASP в сыворотке не образует комплекса с MBL (Thiel, S., et al., J. Immunol. 165:878-887, 2000). Как H-фиколин, так и L-фиколин, связываются со всеми MASP и активируют лектиновый путь комплемента таким же образом, как это делает MBL (Dahl, M.R., et al., Immunity 15: 127-35, 2001; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 165:3502-3506, 2002). Оба пути, лектиновый путь и классический путь, образуют общую C3-конвертазу (C4b2a), и на этой стадии эти два пути сходятся.

Общепризнано, что лектиновый путь играет важную роль в защите от инфекции не подвергавшегося инфицированию организма-хозяина. Убедительные доказательства участия MBL в защите организма-хозяина приводятся в исследованиях пациентов со сниженными уровнями функционального MBL в сыворотке (Kilpatrick, D.C., Biochim. Biophys. Acta 1572:401-413, 2002). У этих пациентов наблюдается предрасположенность к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Такие симптомы обычно проявляются в молодом возрасте в течение четко выраженного временного интервала пониженной сопротивляемости организма по мере снижения титров материнских антител, но до развития гуморального ответа с образованием полного репертуара антител. Этот синдром часто является следствием мутаций в нескольких сайтах коллагеновой части MBL, которые препятствуют нормальному образованию олигомеров MBL. Однако, поскольку MBL может функционировать как опсонин независимо от комплемента, то неизвестно, в какой степени повышение предрасположенности к инфекции обусловлено нарушением активации комплемента.

В отличие от классического и лектинового путей, не было обнаружено каких-либо инициаторов альтернативного пути, которые обеспечивали бы функции распознавания, присущие C1q и лектинам в двух других путях. В настоящее время является общепризнанным, что альтернативный путь спонтанно подвергается циклической активации с низким уровнем, который может легко усиливаться на чужеродных или других аномальных поверхностях (бактериях, дрожжах, инфицированных вирусом клетках или поврежденной ткани), не имеющих собственных молекулярных элементов, которые контролируют спонтанную активацию комплемента. Существует четыре белка плазмы, непосредственно участвующие в активации альтернативного пути, а именно, C3, факторы B и D, и пропердин.

Уже имеется большое количество доказательств участия классического и альтернативного путей

активации комплемента в патогенезе неинфекционных заболеваний у человека, но роль лектинового пути еще только предстоит выяснить. Недавние исследования доказали, что активация лектинового пути может вызывать активацию комплемента и связанное с этим воспаление при ишемии/реперфузионном повреждении. В публикации Collard, CD., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, 2000 было показано, что культивированные эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связывают MBL и обнаруживают осаждение C3 после воздействия на них человеческой сыворотки. Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими моноклональными антителами против MBL приводила к ингибированию связывания MBL и активации комплемента. Эти выводы были уточнены на экспериментальной модели реперфузии при миокардиальной ишемии на крысах, когда у крыс, подвергнутых обработке блокирующим антителом против крысиного MBL, наблюдалось значительное уменьшение повреждения миокарда после окклюзии коронарной артерии, по сравнению с крысами, подвергнутыми обработке контрольным антителом (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413-1418, 2001). Молекулярный механизм связывания MBL с эндотелием сосудов после окислительного стресса остается пока неясным, однако последние исследования позволяют предположить, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием MBL с цитокератинами эндотелия сосудов, а не с гликоконъюгатами (Collard, CD., et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, 2001). В других исследованиях была выявлена роль классического и альтернативного пути в патогенезе ишемии/реперфузионного повреждения, а роль лектинового пути при этом заболевании пока остается предметом дискуссий (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

В недавних исследованиях было показано, что для превращения фактора D, то есть фермента активации альтернативного пути, из его зимогенной формы в ферментативно активную форму необходим MASP-1 (и, возможно, также MASP-3) (см. публикацию Takahashi M. et al., *J. Exp. Med.* 207(1):29-37 (2010)). На физиологическую важность этого процесса указывает отсутствие функциональной активности альтернативного пути в плазме MASP-1/3-дефицитных мышей. Для функционирования альтернативного пути необходимо протеолитическое продуцирование C3b из нативного C3. Поскольку C3-конвертаза альтернативного пути (C3bBb) содержит C3b в качестве основной субъединицы, то вопрос относительно происхождения первого C3b по альтернативному пути представляет собой запутанную проблему и требует проведения глубоких исследований.

C3 принадлежит к семейству белков (наряду с C4 и с макроглобулином α -2), которые содержат редкую посттрансляционную модификацию, известную как тиоэфирная связь. Тиоэфирная группа состоит из глутамина, у которого концевая карбонильная группа образует ковалентную тиоэфирную связь с сульфгидрильной группой цистеина без трех аминокислот. Эта связь является нестабильной, и электрофильный глутамил-тиоэфир может взаимодействовать с нуклеофильными группами, такими как гидроксильные группы или аминогруппы, образуя в результате ковалентную связь с другими молекулами. Тиоэфирная связь является достаточно стабильной при секвестировании в гидрофобном кармане интактного C3. Однако протеолитическое расщепление C3 на C3a и C3b приводит к воздействию высоко реакционноспособной тиоэфирной связи на C3b, и после нуклеофильной атаки находящихся рядом фрагментов, содержащих гидроксильные группы или аминогруппы, C3b становится ковалентно связанной с мишенью. Считается, что помимо хорошо подтвержденной роли C3-тиоэфира в ковалентном связывании C3b с мишенями комплемента, C3-тиоэфир также играет главную роль в запуске альтернативного пути. В соответствии с общепризнанной "теорией холостой активации", альтернативный путь инициируется продуцированием конвертазы в жидкой фазе, iC3Bb, которая образуется из C3 вместе с гидролизованым тиоэфиром (iC3; C3 (H₂O)) и фактором В (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, 1984). C3b-подобный C3(H₂O) продуцируется из нативного C3 в результате медленного самопроизвольного гидролиза внутреннего тиоэфира, присутствующего в белке (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med.* 154:856-867, 1981). Благодаря активности C3(H₂O)Bb-конвертазы, молекулы C3b осаждаются на поверхности мишени, и тем самым инициируют альтернативный путь.

Об инициаторах активации альтернативного пути известно очень мало. Считается, что активаторами могут быть стенки дрожжевых клеток (зимосан), многие чистые полисахариды, кроличьи эритроциты, некоторые иммуноглобулины, вирусы, грибы, бактерии, опухолевые клетки животных, паразиты и поврежденные клетки. Единственным общим признаком для этих активаторов является присутствие углевода, однако, вследствие сложности и разнообразия углеводных структур, трудно определить общие молекулярные детерминанты для распознавания. Общепринятым является мнение, что активация альтернативного пути регулируется посредством точного баланса между ингибирующими регуляторными компонентами этого пути, такими как фактор H, фактор I, DAF и CR1, и пропердином, который является единственным позитивным регулятором альтернативного пути (см. Schwaebler W.J. and Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999)).

Помимо явно нерегулируемого механизма активации, описанного выше, альтернативный путь может также обеспечивать мощную петлевую амплификацию для C3-конвертазы (C4b2a) лектинового/классического пути, поскольку любой продуцируемый C3b может участвовать вместе с фактором В в образовании дополнительной C3-конвертазы (C3bBb) альтернативного пути. C3-конвертаза альтернативного пути стабилизируется посредством связывания пропердина. Пропердин увеличивает время полу-

жизни C3-конвертазы альтернативного пути в 6-10 раз. Добавление C3b к C3-конвертазе альтернативного пути приводит к образованию C5-конвертазы альтернативного пути.

Считают, что все три пути (то есть классический, лектиновый и альтернативный) сходятся в C5, при расщеплении которого образуются продукты, обладающие множеством провоспалительных эффектов. Путь, в котором сходятся все три пути, был назван путем конечных продуктов активации комплемента. C5a представляет собой исключительно сильный анафилотоксин, индуцирующий изменение тонуса гладких мышц и сосудов, а также сосудистой проницаемости. Он также является сильным хемотаксином и активатором нейтрофилов и моноцитов. C5a-опосредуемая клеточная активация может значительно усиливать воспалительные реакции путем индуцирования высвобождения множества дополнительных медиаторов воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и активные формы кислорода. Расщепление C5 приводит к образованию C5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (MAC). В настоящее время существуют убедительные доказательства того, что сублитическое осаждение MAC, помимо его роли как литического порообразующего комплекса, может играть важную роль в воспалительном процессе.

Система комплемента, помимо ее важной роли в иммунной защите, способствует повреждению ткани при многих клинических состояниях. Поэтому, создание терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих побочных эффектов является острой необходимостью.

Сущность изобретения

Описание сущности изобретения предназначено для ознакомления с выбором концепций в упрощенной форме, которые дополнительно описаны ниже в разделе "Подробное описание изобретения". Это описание сущности изобретения не предназначено ни для определения ключевых признаков заявленного предмета изобретения, ни для использования в качестве вспомогательной информации при определении объема заявленного предмета изобретения.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ ингибирования повреждения клеток эндотелия капилляров и/или тромбообразования у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии (ТМА), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от ТМА или подвержен риску развития ТМА, выбранной из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) и атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS). В некоторых вариантах осуществления перед введением композиции, субъекта подвергают обследованию на наличие одного или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из (i) анемии, (ii) тромбоцитопении (iii) почечной недостаточности и (iv) повышения креатинина, и композицию вводят в эффективном количестве и в течение периода времени, достаточного для улучшения одного или более указанных симптомов. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров.

В другом аспекте изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от атипичного гемолитического уремического синдрома или подверженного риску развития атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления перед введением композиции, субъекта подвергают обследованию на наличие одного или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из (i) анемии, (ii) тромбоцитопении (iii) почечной недостаточности и (iv) повышения креатинина, и композицию вводят в эффективном количестве и в течение периода времени, достаточного для улучшения одного или более указанных симптомов. В одном варианте осуществления субъект страдает от аHUS, не зависящего от фактора H, или подвержен риску развития аHUS, не зависящего от фактора H. В одном варианте осуществления субъект страдает от аHUS, связанного с фактором I, фактором В или мембранным кофакторным белком CD46. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте изобретение предлагает способ снижения вероятности того, что субъект, подверженный риску развития атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS), будет испытывать клинические симптомы, связанные с аHUS. Способ по этому аспекту изобретения включает (a) определение присутствия у субъекта генетического маркера, по поводу которого известно, что он связан с аHUS; (b) периодическое обследование субъекта с целью определения наличия или отсутствия по меньшей мере одного симптома, выбранного из группы, состоящей из анемии, тромбоцитопении, почечной

недостаточности и повышения креатинина; и (с) введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента после определения наличия по меньшей мере одного из симптомов, такого как анемия, тромбоцитопения, почечная недостаточность или повышение креатинина, где композицию вводят в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для улучшения одного или более указанных симптомов. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления способа, стадия (а) включает проведение генетического скрининг-теста на образце, взятом у пациента, и выявление присутствия по меньшей мере одного генетического маркера, связанного с aHUS, в гене, выбранного из группы, состоящей из фактора комплемента H (CFH), фактора комплемента I (CFI), фактора комплемента B (CFB), мембранного кофакторного белка CD46, C3, белка, сходного с комплементом фактора H (CFHR1), антикоагулянтного белка тромбодулина (THBD), белка 3, сходного с комплементом фактора H (CFHR3) и белка 4, сходного с комплементом фактора H (CFHR4). В одном варианте осуществления способ дополнительно включает постоянное обследование субъекта на предмет возникновения события, по поводу которого известно, что оно связано с инициированием клинических симптомов aHUS, и введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее средство, до, во время или после возникновения инициирующего события. В одном варианте осуществления событие, связанное с инициированием клинических симптомов aHUS, выбирают из группы, состоящей из продолжительного воздействия лекарственного средства, инфекции, злокачественного новообразования, повреждение, трансплантации органа или ткани и беременности. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. В одном варианте осуществления композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего на фоне инфекции от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) или подверженного риску развития на фоне инфекции атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от некишечного aHUS, связанного с пневмококковой инфекцией, или подвержен риску развития некишечного aHUS, связанного с пневмококковой инфекцией. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента, где введение MASP-2 ингибирующего средства осуществляют через внутривенный катетер или другим методом доставки через катетер. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента методом плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее средство, вводят без применения метода плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее средство, вводят через катетер в течение первого промежутка времени, затем проводят введение композиции, включающей MASP-2 ингибирующее средство, в течение второго промежутка времени, где в течение второго промежутка времени композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента относительно нормального значения или уровня у здорового субъекта служит указанием на продолжение лечения с помощью композиции. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) или обнаруживающего симптомы, указывающие на диагноз ТТП, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента, где введение

MASP-2 ингибирующего средства осуществляют через внутривенный катетер или другим методом доставки через катетер. В одном варианте осуществления у субъекта обнаруживается по меньшей мере один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из вовлечения в патологический процесс центральной нервной системы, тромбоцитопении, серьезного сердечного нарушения, серьезного легочного нарушения, инфаркта желудочно-кишечного тракта и гангрены. В одном варианте осуществления у субъекта обнаруживают положительные результаты теста на присутствие ингибитора ADAMTS13, и способ дополнительно включает введение иммунодепрессанта субъекту. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее средство, вводят в течение первого промежутка времени без применения метода плазмафереза. В одном варианте осуществления у субъекта обнаруживают положительные результаты теста на присутствие ингибитора ADAMTS13, и способ дополнительно включает введение ADAMTS-13. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента с использованием метода плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее средство, вводят с использованием метода плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее средство, вводят через катетер в течение первого промежутка времени, затем проводят введение композиции, включающей MASP-2 ингибирующее средство, в течение второго промежутка времени, где в течение второго промежутка времени композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента относительно нормального значения или уровня у здорового субъекта служит указанием на продолжение лечения с помощью композиции. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от рефрактерной тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента относительно нормального значения или уровня у здорового субъекта служит указанием на продолжение лечения с помощью композиции. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент, такое как моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует повреждение клеток эндотелия капилляров. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство ингибирует тромбообразование.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии (ТМА) или подверженного риску развития тромботической микроангиопатии (ТМА), где ТМА представляет собой по меньшей мере одну из (i) ТМА на фоне рака; (ii) ТМА на фоне химиотерапии, или (iii) ТМА на фоне трансплантации, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от ТМА на фоне рака или подвержен риску развития ТМА на фоне рака, и MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту в количестве, эффективном для снижения риска развития ТМА или снижения тяжести ТМА. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от ТМА на фоне химиотерапии или подвержен риску развития ТМА на фоне химиотерапии, и MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту до, во время или после химиотерапии в количестве, эффективном для снижения риска развития ТМА или снижения тяжести ТМА. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от ТМА на фоне трансплантации или подвержен риску развития ТМА на фоне трансплантации, и MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту до, во время или после процедуры трансплантации в количестве, эффективном для снижения риска развития ТМА или снижения тяжести ТМА. В некоторых вариантах осуществления процедура трансплантации представляет собой трансплантацию аллогенных гематопоетических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, такого как гуманизированное антитело против C5 или его антиген-связывающий фрагмент, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации

комплемента у субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана или подверженного риску развития синдрома Апшо-Шульмана (USS), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, подверженного риску развития USS, где способ включает введение количества MASP-2 ингибирующего средства в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения одного или более клинических симптомов, связанных с ТТР. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает периодическое обследование субъекта и введение MASP-2 ингибирующего средства после выявления события, по поводу которого известно, что оно связано с иницированием клинических симптомов ТТР. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает периодическое обследование субъекта и введение MASP-2 ингибирующего средства после выявления наличия анемии, тромбоцитопении или повышенного креатина. В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, такого как гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, такого как гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение предлагает способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, такого как гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такого как экулизумаб.

В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов по изобретению, MASP-2 ингибирующее средство представляет собой MASP-2 ингибирующее антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело практически не ингибирует классический путь. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство

представляет собой моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления the антитело против MASP-2 или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой одноцепочечную молекулу. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело выбирают из группы, состоящей из молекулы IgG1, молекулы IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой молекулу IgG4, включающую S228P мутацию. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело связывает человеческую MASP-2 с константой диссоциации KD 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело связывает эпитоп в CCP1 домене MASP-2. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b при анализе *in vitro* в 1% сыворотке человека с величиной IC₅₀ 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% сыворотке человека с величиной IC₅₀ 30 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов по изобретению, MASP-2 ингибирующее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает: (а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую

щую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67; и (b) вариабельную область легкой цепи, включающей: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее моноклональное тело включает вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа, распознаваемого контрольным антителом, включающим вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как в последовательности SEQ ID NO: 70.

В другом аспекте изобретения, предлагаются способы ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающие введение субъекту количества MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови субъекта, страдающего от aHUS, по меньшей мере на 40% по сравнению с сывороткой не подвергавшегося лечению субъекта. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови субъекта, страдающего от aHUS, на уровне по меньшей мере на 20% большим (например по меньшей мере на 30% большим, по меньшей мере на 40% большим или по меньшей мере 50% большим), чем его ингибирующее действие на отложение C5b-9 в сыворотке крови того же самого субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект находится в острой фазе aHUS. В некоторых вариантах осуществления субъект находится в фазе ремиссии aHUS. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с частью последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой одноцепочечную молекулу. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело выбирают из группы, состоящей из молекулы IgG1, молекулы IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой молекулу IgG4, включающую S228P мутацию. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело связывает человеческую MASP-2 с константой диссоциации KD 10 nM или менее. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело связывает эпитоп в CCP1 домене MASP-2. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b при анализе *in vitro* в 1% сыворотке человека с величиной IC₅₀ 10 nM или менее. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% сыворотке человека с величиной IC₅₀ 30 nM или менее. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее моноклональное тело или его антигенсвязывающий фрагмент включает: (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67; и (b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее моноклональное тело включает вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа, распознаваемого контрольным антителом, включающим вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как в последовательности SEQ ID NO: 70.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего резистентным к плазматерапии aHUS, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой моно-

клональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывает человеческую MASP-2. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, где ингибитор активации терминальных компонентов представляет собой гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента методом плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, включающую MASP-2 ингибирующее антитело, вводят без применения метода плазмафереза.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от ТМА, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело против MASP-2 или его фрагмент, которое специфически связывает человеческую MASP-2. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению ингибитором активации терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от ТМА, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток, которая резистентна к лечению с помощью переливания тромбоцитов и/или резистентна к лечению методом плазмафереза. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, обусловленных ТМА, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток, таких как увеличение количества тромбоцитов (например, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза по сравнению с количеством тромбоцитов до лечения), увеличение гаптоглобина и/или снижение лактатдегидрогеназы.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения человека, страдающего от персистирующей ТМА, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток (HSCT-ТМА), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выявление человека, имеющего персистирующую ТМА, связанную с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток, до стадии введения субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает человеческую MASP-2. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке крови с величиной IC_{50} 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 последовательности аминокислот, обозначаемой как последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательности аминокислот, обозначаемой как последовательность SEQ ID NO: 70. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят пациенту без применения метода плазмафереза. В одном варианте осуществления субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению гуманизированным антителом против C5 или его антигенсвязывающим фрагментом, так что в этом случае ингибитором активации терминальных компонентов комплемента является гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более из следующих клинических параметров, обусловленных персистирующей ТМА, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток: (i) увеличение количества тромбоцитов (например, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза по сравнению с количеством тромбоцитов до лечения); (ii) увеличение гаптоглобина; (iii) снижение лактатдегидрогеназы (LDH); и/или (iv) снижение креатинина.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает композицию для ингибирования негативных последствий MASP-2 зависимой активации комплемента, включающие терапевтически эффективное ко-

личество MASP-2 ингибирующего средства, такого как MASP-2 ингибирующее антитело, и фармацевтически приемлемый носитель. Предлагаются также способы производства лекарственного препарата для применения для ингибирования негативных последствий MASP-2 зависимой активации комплемента у живых субъектов, нуждающихся в этом, включающего терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства в фармацевтическом носителе. Предлагаются также способы производства лекарственного препарата для применения при ингибировании MASP-2 зависимой активации комплемента для лечения каждого из описанных в изобретении ниже состояний, заболеваний и нарушений.

Способы, композиции и лекарственные препараты по изобретению могут применяться для ингибирования негативных последствий MASP-2 зависимой активации комплемента *in vivo* у млекопитающих, в том числе людей, страдающих от тромботической микроангиопатии (ТМА) или подверженных риску развития тромботической микроангиопатии (ТМА), как это описано далее в изобретении.

Описание чертежей

Изложенные выше аспекты и многие из преимуществ этого изобретения можно более легко оценить, и они станут более понятными в результате ознакомления со следующим далее подробным описанием в сочетании с сопровождающими его чертежами, где:

- на фиг. 1 представлена схема, иллюстрирующая геномная структура человеческой MASP-2;
- на фиг. 2A представлена принципиальная схема, иллюстрирующая доменную структуру белка MASP-2 человека;
- на фиг. 2B представлена принципиальная схема, иллюстрирующая доменную структуру белка MAP19 человека;
- на фиг. 3 представлена схема, иллюстрирующая стратегию MASP-2 нокаута у мышей;
- на фиг. 4 представлена схема, иллюстрирующая минигенную конструкцию MASP-2 человека;
- на фиг. 5A представлены результаты, указывающие на то, что дефицит MASP-2 приводит к исчезновению опосредованной лектиновым путем C4 активации, измеряемому по отсутствию отложения C4b на маннани, как это описано в примере 2;
- на фиг. 5B представлены результаты, которые демонстрируют, что дефицит MASP-2 приводит к исчезновению опосредованной лектиновым путем C4 активации, что измеряется по отсутствию отложения C4b на зимозане, как это описано в примере 2;
- на фиг. 5C представлены результаты, демонстрирующие относительные уровни активации C4 в образцах сыворотки крови, полученные из MASP-2^{+/+}; MASP-2^{-/-} и немутантных штаммов, измеренные по отложению C4b на маннани и на зимозане, как это описано в примере 2;
- на фиг. 6 представлены результаты, которые демонстрируют, что добавление мышинной рекомбинантной MASP-2 к MASP-2^{-/-}-образцам сыворотки восстанавливает опосредованную лектиновым путем C4 активацию в зависимости от концентрации белка, что измеряется по отложению C4b на маннани, как это описано в примере 2;
- на фиг. 7 представлены результаты, которые демонстрируют, что в MASP-2^{-/-} штамме задействован классический путь, как это описано в примере 8;
- на фиг. 8A представлены результаты, которые демонстрируют, что фрагмент Fab2 антитела #11 против MASP-2 ингибирует образование C3-конвертазы, как это описано в примере 10;
- на фиг. 8B представлены результаты, которые демонстрируют, что фрагмент Fab2 антитела #11 против MASP-2 связывается с нативной MASP-2 крысы, как это описано в примере 10;
- на фиг. 8C представлены результаты, которые демонстрируют, что фрагмент Fab2 антитела #41 против MASP-2 ингибирует расщепление C4, как это описано в примере 10;
- на фиг. 9 представлены результаты, которые демонстрируют, что, как было обнаружено, все исследуемые фрагменты Fab2 антител против MASP-2, которые ингибировали образование C3-конвертазы, также ингибируют расщепление C4, как это описано в примере 10;
- на фиг. 10 представлена схема, иллюстрирующая рекомбинантные полипептиды, полученные из крысиной MASP-2, которые использовали для картирования эпитопа блокирующих фрагментов Fab2 антител против MASP-2, как это описано в примере 11;
- на фиг. 11 представлены результаты, демонстрирующие связывание фрагмента Fab2 антител #40 и #60 против MASP-2 с крысиными MASP-2 полипептидами, как это описано в примере 11;
- на фиг. 12 представлены результаты, демонстрирующие клиренс азота мочевины крови для немутантных (+/+) и MASP-2 (-/-) мышей через 24 и 48 ч после реперфузии в экспериментальной модели ишемии почки/реперфузионного повреждения, как это описано в примере 12;
- на фиг. 13A представлены результаты, показывающие исходные уровни белка VEGF в комплексе пигментного эпителия сетчатки (RPE) и сосудистой оболочки глаза, выделенном из немутантных (+/+) и MASP-2 (-/-) мышей, как это описано в примере 13;
- на фиг. 13B представлены результаты, показывающие исходные уровни белка VEGF в комплексе пигментного эпителия сетчатки (RPE) и сосудистой оболочки глаза у немутантных (+/+) и MASP-2 (-/-) мышей через 3 дня после вызванного лазером повреждения в экспериментальной модели дегенерации желтого пятна, как это описано в примере 13;
- на фиг. 14 представлены результаты, показывающие средний объем неоваскуляризации сосудистой

оболочки глаза (CNV) через семь дней после вызванного лазером повреждения у немутантных (+/+) и MASP-2 (-/-) мышей, как это описано в примере 13;

на фиг. 15A и 15B представлены кривые зависимости "доза-эффект" для ингибирования отложения C4b (фиг. 15A) и ингибирования активации тромбина (фиг. 15B) после введения Fab2 фрагмента антитела против MASP-2 в сыворотку здоровых крыс, как это описано в примере 14;

на фиг. 16A и 16B представлена измеренная агрегация тромбоцитов (выраженная как площадь агрегации) у MASP-2 (-/-) мышей (фиг. 16B) по сравнению с агрегацией тромбоцитов у неподвергнутых лечению немутантных мышей и немутантных мышей, у которых путь активации комплемента ингибирован с помощью кровопускательного средства на основе фактора из яда кобры (CVF) и ингибитора активации терминальных компонентов комплемента (C5aR антагониста) (фиг. 16A) в экспериментальной модели локализованного генерализованного феномена Шварцмана диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, как это описано в примере 15;

на фиг. 17 графически представлены уровни азота мочевины крови (BUN), измеренные или у WT (+/+) мышей (B6), или MASP-2 (-/-) мышей, которым трансплантировали донорские почки мышей WT (+/+), как это описано в примере 16;

на фиг. 18 графически представлен процент выживших WT (+/+) мышей и MASP-2 (-/-) мышей в зависимости от числа дней, прошедших после микробного инфицирования в экспериментальной модели лигирования и последующего пунктирования слепой кишки (CLP), как это описано в примере 17;

на фиг. 19 графически представлено число бактерий, измеренное у WT (+/+) мышей и MASP-2 (-/-) мышей после микробного инфицирования в экспериментальной модели лигирования и последующего пунктирования слепой кишки, как это описано в примере 17;

на фиг. 20 представлена кривая Каплана-Мейера, иллюстрирующая процент выживания WT (+/+) мышей, MASP-2 (-/-) мышей и C3 (-/-) мышей через шесть дней после интраназального введения им бактерий синегнойной палочки, как это описано в примере 18;

на фиг. 21 графически представлен уровень отложения C4b, измеренный как % контроля, в образцах, взятых в различные моменты времени после подкожного введения WT мышам дозы или 0,3 мг/кг, или 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2, как это описано в примере 19;

на фиг. 22 графически представлен уровень отложения C4b, измеренный как % контроля, в образцах, взятых в различные моменты времени после внутрибрюшинного введения WT мышам дозы 0,6 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2, как это описано в примере 19;

на фиг. 23 графически представлен средний объем неоваскуляризации сосудистой оболочки глаза (CNV) через семь дней после вызванного лазером повреждения у WT (+/+) мышей, подвергнутых предварительному лечению с помощью разовой внутрибрюшинной инъекции 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2, как это описано в примере 20;

на фиг. 24A графически представлен процент выживания MASP-2 (-/-) мышей и WT (+/+) мышей после инфицирования с помощью 5×10^8 КОЕ/100 мкл менингококка, как это описано в примере 21;

на фиг. 24B графически представлены значения log колониеобразующие единицы/мл менингококка, полученные в различные моменты времени для проб крови, взятых у MASP-2 KO (-/-) мышей и WT (+/+) мышей, инфицированных с помощью 5×10^8 КОЕ/100 мкл менингококка, как это описано в примере 21;

на фиг. 25A графически представлен процент выживания MASP-2 KO (-/-) мышей и WT (+/+) мышей после инфицирования с помощью 2×10^8 КОЕ/100 мкл менингококка, как это описано в примере 21;

на фиг. 25B графически представлены значения log КОЕ/мл менингококка, полученные в различные моменты времени для проб крови, взятых у WT (+/+) мышей, инфицированных с помощью 2×10^8 КОЕ/100 мкл менингококка, как это описано в примере 21;

на фиг. 25C графически представлены значения log КОЕ/мл менингококка, полученные в различные моменты времени для проб крови, взятых у MASP-2 (-/-) мышей, инфицированных с помощью 2×10^8 КОЕ/100 мкл менингококка, как это описано в примере 21;

на фиг. 26A графически представлены результаты исследования отложения C3b, которые демонстрируют, что у MASP-2 (-/-) мышей сохраняется функциональный классический путь, как это описано в примере 22;

на фиг. 26B графически представлены результаты исследования отложения C3b на покрытых зимозаном планшетах, которые демонстрируют, что у MASP-2 (-/-) мышей сохраняется функциональный альтернативный путь, как это описано в примере 22;

на фиг. 27A графически представлена потеря ткани, вызванная ишемией миокарда/реперфузионным повреждением (MIRI) после лигирования левой передней нисходящей ветви коронарной артерии (LAD) и реперфузии у C4 (-/-) мышей (n=6) и для контроля у однопометных WT мышей (n=7), характеризуемая подверженной риску площадью (AAR) и размером инфаркта (INF), как это описано в примере 22;

на фиг. 27B графически представлена зависимость размера инфаркта (INF) от подверженной риску площади (AAR) у C4 (-/-) мышей и WT мышей, подвергнутых лечению, описанному на фиг. 42A, которая демонстрирует, что C4 (-/-) мыши также чувствительны к MIRI, как и используемые для контроля WT мыши (пунктирная линия), как это описано в примере 22;

на фиг. 28А графически представлены результаты исследования отложения C3b при использовании сыворотки от WT мышей, C4 (-/-) мышей и сыворотки от C4 (-/-) мышей, предварительно инкубированной с маннаном, как это описано в примере 22;

на фиг. 28В графически представлены результаты исследования отложения C3b на сыворотке от WT мышей, C4 (-/-) мышей и MASP-2 (-/-) мышей, смешанной с различными концентрациями фрагмента mAb мышинового антитела против MASP-2 (mAbM11), как это описано в примере 22;

на фиг. 28С графически представлены результаты исследования отложения C3b на сыворотке человека от WT (C4 достаточных) и C4 дефицитных субъектов, и на сыворотке от C4 дефицитных субъектов, предварительно инкубированной с маннаном, как это описано в примере 22;

на фиг. 28D графически представлены результаты исследования отложения C3b на сыворотке человека от WT (C4 достаточных) и C4 дефицитных субъектов, смешанной с фрагментом mAb человеческого антитела против MASP-2 (mAbH3), как это описано в примере 22;

на фиг. 29А графически представлен сравнительный анализ активности C3-конвертазы в плазме различных штаммов декомплементированных мышей, испытанной либо при специфических условиях исследования лектинового пути активации, либо при специфических условиях исследования классического пути активации, как это описано в примере 22;

на фиг. 29В графически представлена кинетика в реальном времени активности C3-конвертазы в плазме различных штаммов декомплементированных мышей, испытанной при специфических условиях исследования лектинового пути активации, как это описано в примере 22;

на фиг. 30 приведены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие активацию C3 человека, которая доказывается присутствием α' цепи, субстратами тромбина FXIa и FXa, как это описано в примере 23;

на фиг. 31 приведены результаты исследования отложения C3 на образцах сыворотки, полученной от WT, MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11 (-/-)/C4 (-/-) и C4 (-/-) мышей, как это описано в примере 23;

на фиг. 32А представлена кривая Каплана-Мейера, иллюстрирующая процент выживания с течением времени после радиоактивного облучения дозой 7,0 грэй у контрольных мышей и мышей, подвергнутых лечению мышинным антителом против MASP-2 (mAbM11) или человеческим антителом против MASP-2 (mAbH6), как это описано в примере 29;

на фиг. 32В представлена кривая Каплана-Мейера, графически иллюстрирующая процент выживания с течением времени после радиоактивного облучения дозой 6,5 грэй у контрольных мышей и мышей, подвергнутых лечению мышинным антителом против MASP-2 (mAbM11) или человеческим антителом против MASP-2 (mAbH6), как это описано в примере 29;

на фиг. 33 представлена кривая Каплана-Мейера, графически иллюстрирующая процент выживания MASP-2 KO мышей и WT мышей после введения инфицирующей дозы $2,6 \times 10^7$ КОЕ менингококка серологической группы А Z2491, которая демонстрирует, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летальности, вызываемой менингококком, как это описано в примере 30;

на фиг. 34 представлена кривая Каплана-Мейера, графически иллюстрирующая процент выживания MASP-2 KO мышей и WT мышей после введения инфицирующей дозы 6×10^6 КОЕ штамма MC58 менингококка серологической группы В, которая демонстрирует, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летальности, вызываемой штаммом MC58 менингококка серологической группы В, как это описано в примере 30;

на фиг. 35 графически представлены величины $\log$ КОЕ/мл штамма MC58 менингококка серологической группы В, полученные в различные моменты времени для проб крови, взятых у MASP-2 KO мышей и WT мышей после внутрибрюшинного инфицирования 6×10^6 КОЕ штамма MC58 менингококка серологической группы В ($n=3$ в различные моменты времени для обеих групп мышей, результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего), которые демонстрируют, что несмотря на то, что MASP-2 KO мыши были инфицированы с помощью той же самой дозы штамма MC58 менингококка серологической группы В, что и WT мыши, тем не менее, MASP-2 KO мыши имели повышенный клиренс при бактериемии по сравнению с WT мышами, как это описано в примере 30;

на фиг. 36 графически представлены средние значения балльной оценки болезненного состояния MASP-2 мышей WT мышей через 3, 6, 12 и 24 ч после инфицирования 6×10^6 КОЕ/100 мкл штамма MC58 менингококка серологической группы В, которые демонстрируют, что MASP-2 дефицитные мыши проявляли высокую устойчивость к инфекции со значительно более низкими значениями балльной оценки болезненного состояния через 6 ч, как это описано в примере 30;

на фиг. 37 представлена кривая Каплана-Мейера, графически иллюстрирующая процент выживания мышей после введения инфицирующей дозы 4×10^6 /100 мкл КОЕ штамма MC58 менингококка серологической группы В, и затем введения через 3 ч после инфицирования либо ингибирующего антитела против MASP-2 (1 мг/кг), либо контрольного изотипного антитела, которая демонстрирует, что антитело против MASP-2 является эффективным для лечения и повышения выживаемости субъектов, инфицированных менингококком, как это описано в примере 31;

на фиг. 38 графически представлены величины $\log$ КОЕ/мл количества жизнеспособных микроор-

ганизмов штамма MC58 менингококка серологической группы В, полученные в различные моменты времени в 20% сыворотке человека после внутрибрюшинного инфицирования с помощью $6,5 \times 10^6$ КОЕ/100 мкл штамма MC58 менингококка серологической группы В через 0, 30, 60 и 90 минут после инкубации в присутствии: (А) сыворотки здорового человека (NHS) плюс человеческое антитело против MASP-2; (В) сыворотки здорового человека (NHS) плюс изотипное контрольное антитело;

(С) MBL-/- сыворотки человека; (D) сыворотки здорового человека (NHS) и (Е) термоинактивированной сыворотки здорового человека (NHS), которые показывают, что комплементзависимое уничтожение менингококка в сыворотке человека значительно усиливалось в результате добавления человеческого антитела против MASP-2, как это описано в примере 32;

на фиг. 39 графически представлены величины $\log$ КОЕ/мл количества жизнеспособных микроорганизмов штамма MC58 менингококка серологической группы В, полученные в различные моменты времени в образцах сыворотки мышей, которые демонстрируют, что сыворотки MASP-2-/- мышей имеют более высокий уровень бактерицидной активности в отношении менингококка, чем сыворотки WT мышей, как это описано в примере 32;

на фиг. 40 графически представлен гемолиз (определяемый путем высвобождения в надосадочную жидкость гемоглобина лизированных мышинных эритроцитов (Crgu/C3-/-), который измеряют фотометрически) покрытых маннаном мышинных эритроцитов под воздействием сыворотки человека в диапазоне концентраций сыворотки. Испытуемые сыворотки включали термоинактивированную (HI) NHS, MBL-/-, NHS+антитело против MASP-2 и NHS для контроля, как это описано в примере 33;

на фиг. 41 графически представлен гемолиз (определяемый путем высвобождения гемоглобина в надосадочную жидкость лизированных эритроцитов WT мышей, который измеряют фотометрически) непокрытых маннаном мышинных эритроцитов под воздействием сыворотки человека в диапазоне концентраций сыворотки. Испытуемые сыворотки включали термоинактивированную (HI) NHS, MBL-/-, NHS+антитело против MASP-2 и NHS для контроля, который демонстрирует, что ингибирование MASP-2 ингибирует комплемент-опосредованный лизис несенсибилизированных эритроцитов WT мышей, как это описано в примере 33;

на фиг. 42 графически представлен гемолиз (определяемый путем высвобождения в надосадочную жидкость гемоглобина лизированных мышинных эритроцитов (CD55/59 -/-), который измеряют фотометрически) непокрытых мышинных эритроцитов под воздействием сыворотки человека в диапазоне концентраций сыворотки. Испытуемые сыворотки включали термоинактивированную (HI) NHS, MBL-/-, NHS+антитело против MASP-2 и NHS для контроля, как это описано в примере 33;

на фиг. 43 графически представлен процент выживания с течением времени (дней) после радиоактивного облучения дозой 8,0 грэй у контрольных мышей и у мышей, подвергнутых лечению человеческим антителом против MASP-2 (mAbH6), как это описано в примере 34;

на фиг. 44 графически представлено время до возникновения окклюзии капилляров после инъекции липополисахарида (LPS) у MASP-2-/- мышей и WT мышей, с указанием процента мышей с тромбообразованием, измеренным в течение 60 минут, которое показывает, что тромбообразование у WT мышей обнаруживается через 15 минут, а через 60 минут тромбообразование наблюдалось у 80% WT мышей; в отличие от этого, ни одной из MASP-2-/- мышей не было обнаружено никаких признаков тромбообразования в течение 60 (логарифмический ранговый критерий: $p=0,0005$), как это описано в примере 35;

на фиг. 45 графически представлен процент выживания контрольных мышей ($n=5$), которым вводили физиологический раствор, и мышей ($n=5$), которым вводили антитело против MASP-2, в экспериментальной модели гемолитического уремического синдрома (HUS), индуцированного шигаподобным токсином/липополисахаридом (STX/LPS), с течением времени (часов), который показывает, что все контрольные мыши погибали в течение 42 ч, тогда как, в отличие от этого, 100% мышей, которым вводили антитело против MASP-2, оставались живыми на протяжении всего времени проведения эксперимента, как это описано в примере 36;

на фиг. 46 графически представлен процент мышей с окклюзией капилляров в экспериментальной модели флуоресцеин изотиоцианат/декстран УФ-излучение (FITC/Dextran UV) в зависимости от времени после индуцирования повреждения, после введения изотипного контрольного антитела или человеческого антитела mAbH6 против MASP-2 (10 мг/кг) за 16 ч и 1 час перед инъекцией FITC/Dextran, как это описано в примере 37;

на фиг. 47 графически представлено время окклюзии в минутах для мышей, которым вводили человеческое антитело против MASP-2 (mAbH6) и изотипное контрольное антитело, где данные приводятся в виде разброса точек со средними значениями (горизонтальные линии) и линий среднеквадратической ошибки (вертикальные линии). Статистическим критерием, используемым для анализа, являлся критерий Стьюдента для одной выборки; где символ "*" обозначает $p=0,0129$, как это описано в примере 37; и на фиг. 48 графически представлено время до окклюзии в минутах для немутантных мышей, MASP-2 KO мышей и немутантных мышей, которым предварительно вводили внутрибрюшинно человеческое антитело против MASP-2 (mAbH6) в дозе 10 мг/кг за 16 ч до и снова за 1 час до индуцирования тромбоза в экспериментальной модели тромбоза в результате повреждения эндотелиальных клеток, вызванного FITC-декстран/излучением света с низкой интенсивностью (800-1500), как это описано в примере 37;

на фиг. 49 представлена кривая Каплана-Мейера, показывающая процент мышей с тромбами в зависимости от времени при FITC-декстран индуцированной тромботической микроангиопатии у мышей, которым вводили возрастающие дозы человеческого антитела, ингибирующего MASP-2 (mAbH6), или изотипного контрольного антитела, как это описано в примере 39;

на фиг. 50 графически представлено среднее время (в минутах) до возникновения тромбообразования в зависимости от дозы mAbH6 (* $p < 0,01$ по сравнению с контролем), как это описано в примере 39;

на фиг. 51 представлена кривая Каплана-Мейера, показывающая процент мышей с окклюзией капилляров в зависимости от времени при FITC-декстран индуцированной тромботической микроангиопатии у мышей, которым вводили возрастающие дозы ингибирующего человеческого антитела (mAbH6) против MASP-2 или изотипное контрольное антитело, как это описано в примере 39;

на фиг. 52 графически представлено среднее время до возникновения окклюзии капилляров в зависимости от дозы mAbH6 (* $p < 0,05$ по сравнению с контролем), как это описано в примере 39;

на фиг. 53A графически представлен уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии человеческого моноклонального тела (OMS646) против MASP-2 в специфических условиях исследования лектинового пути, который показывает, что OMS646 ингибирует отложение MAC, опосредованное лектиновым путем, с величиной IC_{50} приблизительно 1 нМ, как это описано в примере 40;

на фиг. 53B графически представлен уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии человеческого моноклонального тела (OMS646) против MASP-2 в специфических условиях исследования классического пути, который показывает, что OMS646 не ингибирует отложение MAC, опосредованное классическим путем, как это описано в примере 40;

на фиг. 53C графически представлен уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии человеческого моноклонального тела (OMS646) против MASP-2 в специфических условиях исследования альтернативного пути, который показывает, что OMS646 не ингибирует отложение MAC, опосредованное альтернативным путем, как это описано в примере 40;

на фиг. 54 графически представлен фармакокинетический (PK) профиль человеческого моноклонального тела (OMS646) против MASP-2 у мышей, показывающий концентрацию OMS646 (среднее значение $n=3$ животных/группы) в зависимости от времени после введения указанной дозы, как это описано в примере 40;

на фиг. 55A графически представлен фармакодинамический (PD) ответ на человеческое моноклональное тело (OMS646) против MASP-2, измеренный как снижение системной активности лектинового пути у мышей после внутривенного введения, как это описано в примере 40;

на фиг. 55B графически представлен фармакодинамический (PD) ответ на человеческое моноклональное тело (OMS646) против MASP-2, измеренный как снижение системной активности лектинового пути у мышей после подкожного введения, как это описано в примере 40;

на фиг. 56 графически представлено ингибирующее действие антитела против MASP-2 (OMS646) по сравнению с sCR1 на aHUS индуцированное сывороткой крови отложение C5b-9 на ADP-активированных клетках HMEC-1, как это описано в примере 41;

на фиг. 57 графически представлено ингибирующее действие антитела против MASP-2 (OMS646) по сравнению с sCR1 на aHUS индуцированное сывороткой крови тромбообразование на ADP-активированных клетках HMEC-1, как это описано в примере 42;

на фиг. 58 графически представлено среднее изменение количества тромбоцитов от начального значения с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от персистирующей тромботической микроангиопатии, связанной с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток (HSCT-TMA), после введения ингибирующего антитела (OMS646) против MASP-2, как это описано в примере 46;

на фиг. 59 графически представлено среднее изменение лактатдегидрогеназы (LDH) от начального значения с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от персистирующей тромботической микроангиопатии, связанной с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток (HSCT-TMA), после введения ингибирующего антитела (OMS646) против MASP-2, как это описано в примере 46; и

на фиг. 60 графически представлено среднее изменение гаптоглобина от начального значения с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от персистирующей тромботической микроангиопатии, связанной с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток (HSCT-TMA), после введения ингибирующего антитела (OMS646) против MASP-2, как это описано в примере 46.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO:1 кДНК человеческого MAr19
 SEQ ID NO:2 белок человеческого MAr19 (с лидерной последовательностью)
 SEQ ID NO:3 белок человеческого MAr19 (зрелый)
 SEQ ID NO:4 кДНК человеческой MASP-2
 SEQ ID NO:5 белок человеческой MASP-2 (с лидерной последовательностью)
 SEQ ID NO:6 белок человеческой MASP-2 (зрелый)
 SEQ ID NO:7 геномная ДНК человеческой MASP-2 (эксоны 1-6)
 АНТИГЕНЫ: (ОТНОСЯЩИЕСЯ К ЗРЕЛОМУ БЕЛКУ MASP-2)
 SEQ ID NO:8 последовательность домена CUBI (aa 1-121)
 SEQ ID NO:9 последовательность домена CUBEGF (aa 1-166)
 SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
 SEQ ID NO:11 область EGF (aa 122-166)
 SEQ ID NO:12 домен серин-протеазы (aa 429-671)
 SEQ ID NO:13 инактивированный домен серин-протеазы (aa 610-625 с мутацией Ser618 в Ala)
 SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (пептид домена CUBI)
 SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид домена CUBI)
 SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (ядро области, связывающей MBL)
 SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (ядро области, связывающей MBL)
 SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (ПЕПТИД EGF)
 SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALV (ядро, связывающее серин-протеазу)
 ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ:
 SEQ ID NO:20 полноразмерная кДНК MBL
 SEQ ID NO:21 полноразмерный белок MBL
 SEQ ID NO:22 OGK X GP (консенсус связывания)
 SEQ ID NO:23 OGKLG
 SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
 SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
 SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEFGQGLRGLQGPOGKLGPOG
 SEQ ID NO:27 GAOGSOGEEKGAOGFPQGPPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-фиколин человека)
 SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO

(фиколин р35 человека)

SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (сайт расщепления C4)

ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ:

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

SEQ ID NO:31

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

SEQ ID NO:32

5-GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' Нуклеотиды 361-396 в SEQ ID NO:4, кодирующие участок, содержащий сайт связывания MASP-2 MBL (смысловой)

SEQ ID NO:33

5' AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3' Нуклеотиды 610-642 в SEQ ID NO:4, кодирующие участок, содержащий CUBII домен

ПРАЙМЕРЫ КЛОНИРОВАНИЯ:

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

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

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

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

SEQ ID NO:38-47 представляют собой праймеры клонирования для гуманизированных антител

SEQ ID NO:48 представляет собой пептидную связь из 9 аминокислот

ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ:

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

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

SEQ ID NO:51 представляет собой мышинный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью)

SEQ ID NO:52 представляет собой мышинный белок MASP-2 (зрелый)

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

SEQ ID NO:54 представляет собой крысиный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью)

SEQ ID NO:55 представляет собой крысиный белок MASP-2

(зрелый)

SEQ ID NO:56-59 представляет собой олигонуклеотиды для сайтнаправленного мутагенеза MASP-2 человека, которые используются для получения MASP-2A человека

SEQ ID NO:60-63 представляет собой олигонуклеотиды для сайтнаправленного мутагенеза MASP-2 мыши, которые используются для получения MASP-2A мыши

SEQ ID NO:64-65 представляет собой олигонуклеотиды для сайтнаправленного мутагенеза MASP-2 крысы, которые используются для получения MASP-2A крысы

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

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

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

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

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

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

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на сделанном авторами изобретения поразительном открытии возможности ингибирования опосредованного MASP-2 лектинового пути, не затрагивая при этом классический путь. В настоящем изобретении также описано использование MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования повреждения клеток, связанного с опосредованным лектином путем активации комплемента, не затрагивая при этом компонент классического (C1q зависимого) пути иммунной системы.

I. Определения.

Если в изобретении не определено иначе, то все используемые в изобретении термины имеют значения, которые являются общепринятыми для обычных специалистов в той области, к которой относится настоящее изобретение. Следующие ниже определения представлены для того, чтобы прояснить значения терминов, которые используются в описании и в формуле изобретения для раскрытия настоящего изобретения.

Используемый в изобретении термин "MASP-2-зависимая активация комплемента" включает MASP-2-зависимую активацию лектинового пути, которая происходит в физиологических условиях (то есть в присутствии Ca^{++}), что приводит к образованию C3-конвертазы C4b2a лектинового пути и, после аккумуляции C3b, продукта расщепления C3, к образованию C5-конвертазы C4b2a(C3b)_n, которая, как было выяснено, является главной причиной опсонизации.

Используемый в изобретении термин "альтернативный путь" относится к активации комплемента, которая инициируется, например, зимосаном клеточных стенок грибов и дрожжей, липополисахаридом (ЛПС) внешних мембран грам-отрицательных бактерий, и кроличьими эритроцитами, а также многими чистыми полисахаридами, кроличьими эритроцитами, вирусами, бактериями, опухолевыми клетками животных, паразитами и поврежденными клетками, и которая, как принято считать, является результатом спонтанной протеолитической генерации C3b из фактора комплемента C3.

Используемый в изобретении термин "лектиновый путь" относится к активации комплемента, которая возникает в результате специфического связывания сывороточных и несывороточных углевод-связывающих белков, включающих маннан-связывающий лектин (MBL), CL-11 и фиколины (Н-фиколин, М-фиколин или L-фиколин).

Используемый в изобретении термин "классический путь" относится к активации комплемента, которая инициируется антителом, связанным с чужеродной частицей, и для которой требуется связывание молекулы распознавания C1q.

Используемый в изобретении термин "MASP-2 ингибирующее средство" относится к средству, которое связывает или непосредственно взаимодействует с MASP-2 и эффективно ингибирует MASP-2 зависимую активацию комплемента, и которое включает антитела против MASP-2 и их фрагменты, связывающие MASP-2, природные и синтетические пептиды, низкомолекулярные соединения, растворимые

MASP-2 рецепторы, ингибиторы экспрессии и выделенные природные ингибиторы, а также включают пептиды, которые конкурируют с MASP-2 за связывание с другой молекулой распознавания (например, MBL, Н фиколин, М фиколин или L фиколин) в лектиновом пути, но не включают антитела, которые связываются с другими такими молекулами распознавания. MASP-2 ингибирующие средства, применяемые в способе изобретения, могут снижать MASP-2 зависимую активацию комплемента более чем на 20%, например, более чем на 50%, например, более чем на 90%. В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство снижает MASP-2 зависимую активацию комплемента более чем на 90% (то есть в результате MASP-2 зависимая активация комплемента составляет только 10% или менее).

Используемый в изобретении термин "антитело" охватывает антитела и их фрагменты, полученные от любого млекопитающего, продуцирующего антитела (например, мыши, крысы, кролика и примата, в том числе человека), или из гибридом, фаговым отбором, рекомбинантной экспрессией или от трансгенных животных (или другими методами продуцирования антител или их фрагментов), которые специфически связываются с целевым полипептидом, таким как, например, MASP-2, полипептидами или с их частями. Предполагается, что термин "антитело" не накладывает ограничения на источники происхождения антитела или на способ его получения (например, с помощью гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных, пептидного синтеза и так далее). Примеры антител включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; полиспецифические, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела); гуманизированные антитела; мышинные антитела; химерные, мышино-человеческие, мышино-приматные, примато-человеческие моноклональные антитела и антиидиотипические антитела, и они могут представлять собой любое интактное антитело или его фрагмент. Используемый в изобретении термин "антитело" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, гибридные белки, включающие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом с требуемой специфичностью, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает антигенсвязывающий сайт или фрагмент (эпитоп-распознающий сайт) с требуемой специфичностью.

"Моноклональное антитело" обозначает гомогенную популяцию антител, в которой моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), участвующих в селективном связывании эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными по отношению к целевому антигену. Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их варианты, гибридные белки, включающие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает антигенсвязывающий сайт или фрагмент (эпитоп-распознающий сайт) с требуемой специфичностью и способностью связывать эпитоп. Предполагается, что термин "моноклональное антитело" не накладывает ограничения на источники происхождения антитела или на способ его получения (например, с помощью гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и так далее). Термин включает в себя все иммуноглобулины, а также их фрагменты и так далее, описанные выше для термина "антитело".

Используемый в изобретении термин "фрагмент антитела" обозначает часть, полученную из полноразмерного антитела или относящуюся к полноразмерному антителу, такому как, например, антитело против MASP-2, и эта часть обычно включает антигенсвязывающую или вариабельную область антитела.

Иллюстративными примерами фрагментов антител являются Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂ и Fv фрагменты, scFv фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в изобретении термин "одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела включает VH и VL домены антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Обычно, Fv полипептид дополнительно включает полипептидный линкер между VH и VL доменами, который позволяет scFv образовывать требуемую структуру для антигенсвязывания.

Используемое в изобретении "химерное антитело" представляет собой рекомбинантный белок, который содержит вариабельные домены и участки, определяющие комплементарность, полученный из антитела не принадлежащих к человеческому роду видов животных (например, грызунов), в то время как остальную часть молекулы антитела получают из человеческого антитела.

Используемое в изобретении "гуманизированное антитело" представляет собой химерное антитело, которое включает минимальную последовательность, соответствующую специфическим участкам, определяющим комплементарность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина, которую трансплантируют в каркас человеческого антитела. Гуманизированные антитела обычно представляют собой рекомбинантные белки, в которых только участки антитела, определяющие комплементарность, имеют происхождение не от человека.

Используемый в изобретении термин "маннан-связывающий лектин" ("MBL") является эквивалентным термину "маннан-связывающий белок" ("MBP").

Используемый в изобретении термин "мембраноатакующий комплекс" ("МАС") относится к комплексу пяти конечных компонентов комплемента (C5b вместе с C6, C7, C8 и C9), который внедряется внутрь мембран и разрушает их (его также обозначают C5b-9).

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

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

В самом широком смысле, природные аминокислоты могут быть подразделены на группы на основе химических характеристик боковой цепи соответствующей аминокислоты. Под "гидрофобной" аминокислотой подразумевают любую из Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys либо Pro. Под "гидрофильной" аминокислотой подразумевают любую из Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg и His. Это разделение аминокислот на группы может быть дополнительно разбито на подклассы следующим образом. Под "незаряженной гидрофильной" аминокислотой подразумевают любую из Ser, Thr, Asn или Gln. Под "аминокислотой с кислотными свойствами" подразумевают Glu или Asp. Под "аминокислотой с основными свойствами" подразумевают Lys, Arg или His.

Используемый в изобретении термин "консервативное замещение аминокислоты" может быть проиллюстрирован замещением среди аминокислот внутри каждой из следующих групп: (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, (2) фенилаланин, тирозин и триптофан, (3) серин и треонин, (4) аспартат и глутамат, (5) глутамин и аспарагин, (6) лизин, аргинин и гистидин.

Используемый в изобретении термин "олигонуклеотид" относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметикам. Этот термин также охватывает олигонуклеиновые основания, состоящие из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных связей (между главными цепями), а также олигонуклеотиды, имеющие синтетические модификации.

Используемый в изобретении термин "эпитоп" относится к сайту на белке (например, на белке человеческой MASP-2), который связывается антителом. "Перекрывающиеся эпитопы" включают по меньшей мере один (например, два, три, четыре, пять или шесть) остаток обычной аминокислоты (остатков), включающий линейный и нелинейный эпитопы.

Используемые в изобретении термины "полипептид", "пептид" и "белок" являются взаимозаменяемыми и обозначают любую связанную пептидом цепь аминокислот, вне зависимости от длины или посттрансляционной модификации. Описанный в изобретении белок MASP-2 может содержать немутантные белки или может представлять собой немутантные белки или может быть вариантами, которые не имеют более чем 50 (например, не более чем одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50) консервативных замещений аминокислот. Консервативные замещения обычно включают замещения внутри следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

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

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

Процент (%) тождественности аминокислотной последовательности определяется как процент аминокислот в представляющей интерес последовательности, которые идентичны аминокислотам в эталонной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, в случае необходимости, для достижения максимального процента тождественности последовательности. Выравнивание с целью определения процента тождественности последовательности может достигаться различными методами, которые известны специалисту в этой области, например, путем использования общедоступ-

ного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по полной длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены хорошо известными методами.

II. Общее описание изобретения.

Лектины (MBL, М-фиколин, Н-фиколин, L-фиколин и CL-11) представляют собой специфические молекулы распознавания, которые инициируют врожденную систему комплемента, и эта система включает в себя лектиновый путь инициации и ассоциированную с ним петлю амплификации конечного пути, которая амплифицирует инициированную лектином активацию конечных эффекторных молекул. C1q представляет собой специфическую молекулу распознавания, которая инициирует приобретенную систему комплемента, и эта система включает классический путь инициации и ассоциированную с ним петлю амплификации конечного пути, которая амплифицирует C1q-инициированную активацию конечных эффекторных молекул. Авторы настоящего изобретения называют эти две основные системы активации комплемента лектин-зависимой системой комплемента и C1q-зависимой системой комплемента соответственно.

Система комплемента, помимо ее главной роли в иммунной защите, способствует повреждению ткани при многих клинических состояниях. Поэтому, существует острая необходимость в создании терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих негативных последствий. Обнаружение возможности ингибирования лектинового пути, опосредуемого MASP-2, без затрагивания классического пути позволяет сделать вывод о том, что было бы крайне желательно обеспечивать специфическое ингибирование только системы активации комплемента, которая вызывает конкретную патологию, но не подавляет полностью способности комплемента к иммунной защите. Например, при патологических состояниях, при которых активация комплемента опосредуется преимущественно лектин-зависимой системой комплемента, было бы предпочтительно, чтобы происходило специфическое ингибирование только этой системы. Это позволяло бы не затрагивать систему C1q-зависимой активации комплемента, которая регулирует процессинг иммунного комплекса и способствует защите организма от инфекции.

Предпочтительным белковым компонентом-мишенью при разработке терапевтических средств для специфического ингибирования лектин-зависимой системы комплемента является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов лектин-зависимой системы комплемента (MBL, Н-фиколина, М-фиколина, L-фиколина, MASP-2, C2-C9, фактора В, фактора D и пропердина), только MASP-2 является как уникальной, так и необходимой для функционирования лектин-зависимой системы комплемента. Лектины (MBL, Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и CL-11) также являются уникальными компонентами лектин-зависимой системы комплемента. Однако потеря любого одного из лектиновых компонентов необязательно будет приводить к ингибированию активации системы, что обусловлено избыточным количеством лектина. Для гарантии ингибирования активации лектин-зависимой системы комплемента необходимо ингибировать все пять лектинов. Кроме того, поскольку также известно, что MBL и фиколины обладают опсонинной активностью, не зависящей от комплемента, то ингибирование функции лектина будет приводить к потере этого ценного механизма защиты организма-хозяина от инфекции. В отличие от этого, зависящая от комплемента опсонинная активность лектина будет сохраняться незатронутой, если мишенью для ингибирования активации лектинового пути являлась MASP-2. Дополнительным преимуществом MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования активации лектин-зависимой системы комплемента является то, что концентрация MASP-2 в плазме, по сравнению с любыми другими белками комплемента, является самой низкой (~500 нг/мл), и, поэтому, для достижения полного ингибирования будут достаточными, соответственно, низкие концентрации высокоаффинных ингибиторов MASP-2 (Moller Kristensen, M., et al., J. Immunol Methods 282:159 167, 2003).

III. Роль masp-2 при тромботических микроангиопатиях и терапевтические методы применения masp-2 ингибирующих средств.

Общее описание.

Тромботическая микроангиопатия (ТМА) представляет собой патологию, характеризующуюся наличием тромбов в мелких кровеносных сосудах (Benz, K.; et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 19(3):242-7 (2010)). Считают, что стресс или повреждение подлежащего эндотелия сосудов является основной причиной развития этой патологии. Клиническая картина и данные лабораторных исследований ТМА включают тромбоцитопению, анемию, пурпуру и почечную недостаточность. Классическими примерами ТМА являются гемолитический уремический синдром (HUS) и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП). Лежащей в основе ТМА характерной патологической особенностью является активация тромбоцитов и образование микротромбов в мелких артериолах и венах. Активация комплемента, инициируемая, по меньшей мере, частично, в результате повреждения или стресса эндотелия микрососудов, также вовлечена при других видах ТМА, включающих катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS), системную болезнь Дегоса и ТМА на фоне рака, на фоне противораковой терапии и на фоне трансплантации.

Прямое доказательство патологической роли комплемента во многих случаях нефритов предостав-

ляют исследования пациентов с генетически обусловленной недостаточностью специфических компонентов комплемента. В ряде исследований была показана связь повреждения почек с дефицитом регуляторного фактора комплемента Н (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-956, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-428, 2002). Дефицит фактора Н приводит к низким уровням в плазме фактора В и С3 вследствие связанного с активацией расходования этих компонентов. Циркулирующие в крови уровни C5b-9 также повышены в сыворотке этих пациентов, косвенно указывая на активацию комплемента. Мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (MPGN) и идиопатический гемолитический уремический синдром (HUS) связаны с дефицитом фактора Н или мутациями фактора Н. У фактор Н-дефицитных свиней (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-349, 1998) и фактор-Н нокаутных мышей (Pickering, M.C., 2002) проявляются MPGN подобные симптомы, что подтверждает важность фактора Н при регуляции комплемента. Дефицит других компонентов комплемента связан с заболеванием почек на фоне развития системной красной волчанки (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-281, 1997). Дефицит C1q, C4 и C2 резко провоцирует развитие SLE через механизмы, относящиеся к нарушенному выведению иммунных комплексов и апоптического материала. У многих из этих SLE пациентов возникает волчаночный нефрит, характеризующийся отложением иммунных комплексов на всей поверхности клубочка.

aHUS.

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) является частью группы состояний, называемых "тромботическими микроангиопатиями". При атипичной форме HUS (aHUS), заболевание связано с нарушенной регуляцией комплемента и может быть либо спорадическим, либо наследственным. Наследственные случаи aHUS связаны с мутациями в генах, кодирующих активацию комплемента или регуляторные белки комплемента, включая фактор комплемента Н, фактор I, фактор В, мембранный кофакторный белок CD46, а также белок 1, сходный с комплементом фактора Н (CFHR1) и белок 3, сходный с комплементом фактора Н (CFHR3) (Zipfel, P.F., et al., *PloS Genetics* 3(3):e41 (2007)). Единой чертой этого разнотипного массива генетических мутаций, связанных с aHUS, является склонность к повышенной активации комплемента на поверхности клеток или тканей. Поэтому, один аспект настоящего изобретения включает лечение пациента, страдающего от aHUS, который связан с дефицитом фактора Н, путем введения эффективного количества MASP-2 ингибирующего средства. Другой аспект настоящего изобретения включает лечение пациента, страдающего от aHUS, который связан с дефицитом фактора I, фактора В, мембранного кофакторного белка CD46, CFHR1 или CFHR3, путем введения эффективного количества MASP-2 ингибирующего средства.

Недавно был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярной патофизиологии, лежащей в основе повышенной активации комплемента при aHUS, вызванной разнотипным набором мутантных факторов комплемента. Этот механизм лучше всего изучен для мутаций фактора Н. Фактор Н представляет собой присутствующий в сыворотке белок, включающий 20 доменов коротких консенсусных повторов (SCR), которые действуют в качестве негативного регулятора активации комплемента как в растворе, так и на поверхности клеток организма-хозяина. Он таргетирует активированную форму С3 и, вместе с фактором I и другими кофакторами, промотирует его инактивацию, предвосхищая последующую активацию комплемента. Для эффективного контроля активации комплемента на поверхности клеток организма-хозяина, необходимо взаимодействие фактора Н с клетками организма-хозяина, которое опосредуется SCR доменами 16-20. Все описанные к настоящему времени мутации фактора Н, связанные с aHUS, группируются в С-терминальной области, охватывающей SCR домены 16-20. Эти мутантные белки фактора Н полностью функциональны при контроле активации С3 в растворе, но не способны взаимодействовать с поверхностью клеток организма-хозяина и, следовательно, не могут контролировать активацию С3 на поверхности клеток (*Exp Med* 204(6):1249-56 (2007)). Таким образом, конкретные мутации фактора Н связаны с aHUS, потому что мутантный белок фактора Н не в состоянии взаимодействовать с поверхностями клеток организма-хозяина и, поэтому, не может эффективно модулировать с понижением активацию комплемента на поверхностях клеток организма-хозяина, в том числе на эндотелии микрососудов. В результате, после того как произошла исходная активация С3, последующая активация комплемента на поверхности эндотелия капилляров не ослабевает у пациентов с мутациями фактора Н. Эта неконтролируемая активация комплемента в конце концов приводит к прогрессирующему повреждению эндотелия сосудов, затем к агрегации тромбоцитов и микроваскулярной коагуляции, и гемолизу, вызванному прямым давлением при прохождении эритроцитов через частично окклюзированные микрососуды. Таким образом, болезненные проявления aHUS и его клиническая картина и данные лабораторных исследований непосредственно связаны с нарушением негативного регулирования комплемента на поверхности эндотелия микрососудов.

Аналогично, мутации фактора Н, мутации с потерей функции в негативном модуляторе комплемента факторе I и мембранном кофакторном белке (CD46) также связаны с aHUS. Противоположное наблюдалось для фактора В, белка С3, в случае которых было обнаружено, что aHUS связан с мутациями с приобретением новых функций в этих белках (*Pediatr Nephrol* 25(12):2431-42 (2010)). Таким образом, большое количество сведенных воедино данных непосредственно связывают активацию комплемента с патогенезом aHUS. Эту точку зрения наиболее убедительно подтверждает терапевтическая эффектив-

ность экулизумаба, моноклонального антитела, которое блокирует конечный белок комплемента C5 при лечении aHUS.

В то время как важная роль комплемента в качестве эффекторного механизма при aHUS является общепризнанной, триггеры, инициирующие активацию комплемента, и вовлеченные в активацию молекулярные сигнальные пути остаются пока неизученными. Не у всех индивидуумов, имеющих описанные выше мутации, развивается aHUS. В действительности, исследования наследственных факторов позволили сделать вывод, что частота проявления гена aHUS составляет только ~50% (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010)). Течение заболевания указывает на то, что aHUS более часто развивается после инициирующего события, такого как вспышка инфекции или повреждение. Хорошо известно, что возбудители инфекции активируют систему комплемента. В отсутствие уже существующего приобретенного иммунитета, активация комплемента возбудителями инфекции может быть инициирована, прежде всего, по лектиновому пути. Таким образом, лектиновый путь активации, запускаемый инфекцией, может представлять собой инициирование триггера для последующей патологической амплификации активации комплемента у aHUS-предрасположенных индивидуумов, которая может в конце концов приводить к развитию болезни. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения включает лечение пациента, страдающего от aHUS на фоне инфекции, путем введения эффективного количества MASP-2 ингибирующее средство.

Активировать комплемент по лектиновому пути будут и другие формы повреждения ткани организма-хозяина, в частности, повреждение эндотелия сосудов. Клетки эндотелия сосудов человека подвергаются окислительному стрессу, например, в ответ на экспрессию поверхностных фрагментов, которые связывают лектины и активируют лектиновый путь комплемента (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). Повреждение сосудов после ишемии/реперфузии также активирует комплемент по лектиновому пути *in vivo* (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). Активация лектинового пути в этих условиях приводит к патологическим последствиям для организма-хозяина, и ингибирование лектинового пути путем блокирования MASP-2 предотвращает последующее повреждение ткани организма-хозяина и неблагоприятный исход (Schwaebble PNAS 2011).

Таким образом, хорошо известно, что другие процессы, которые провоцируют aHUS, также активируют лектиновый путь комплемента. Поэтому, лектиновый путь может, по-видимому, представлять механизм исходной активации комплемента, который несоответствующим образом и нерегулируемо усиливается у индивидуумов, генетически предрасположенных к aHUS, тем самым инициируя патогенез aHUS. Исходя из этого, можно ожидать, что средства, которые блокируют активацию комплемента по лектиновому пути, в том числе антитела против MASP-2, должны предотвращать развитие заболевания или уменьшать обострения у индивидуумов, предрасположенных к возникновению aHUS.

В подтверждение этой концепции, в недавних исследованиях был идентифицирован пневмококк в качестве важного этиологического фактора при педиатрических случаях aHUS (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). По-видимому, эта особая этиология имеет неблагоприятный прогноз с высокой смертностью и продолжительным течением болезни. Причем, эти случаи включали некишечные инфекции, приводящие к проявлениям микроангиопатии, уремии и гемолиза без доказательства сопутствующих мутаций в генах комплемента, по поводу которых известно, что они провоцируют aHUS. Важно отметить, что пневмококк является особенно эффективным при активации комплемента, и действует таким образом преимущественно через лектиновый путь. Поэтому, предполагается, что в случаях некишечного HUS, связанного с пневмококковой инфекцией, проявления микроангиопатии, уремии и гемолиза будут обусловлены преимущественно активацией лектинового пути, и можно ожидать, что средства, которые блокируют лектиновый путь, в том числе антитела против MASP-2, будут предотвращать развитие aHUS и уменьшать тяжесть заболевания у этих пациентов. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения включает лечение пациента, страдающего от некишечного aHUS, который связан с пневмококковой инфекцией, путем введения эффективного количества MASP-2 ингибирующее средство.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления, в случае субъекта, подверженного риску развития почечной недостаточности, связанной с aHUS, предлагается способ снижения вероятности развития aHUS или развития почечной недостаточности, связанной с aHUS, включающий введение количества MASP-2 ингибирующего средства в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения почечной недостаточности у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию определения, подвержен ли субъект риску развития aHUS до проявления любых симптомов, связанных с aHUS. В других вариантах осуществления, способ включает определение, подвержен ли субъект риску развития aHUS после проявления по меньшей мере одного или более симптомов, указывающих на aHUS (например, наличие анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности) и/или наличие тромботической микроангиопатии в биоптате, взятом у субъекта. Определение, подвержен ли субъект риску развития aHUS, включает определение, имеет ли субъект генетическую предрасположенность к развитию aHUS, которое может проводиться путем оценки генетической информации (например, из базы данных, содержащей генотип субъекта) или путем проведения по меньшей мере одного генетического скрининга субъекта для определения присутствия или

отсутствия генетического маркера, связанного с aHUS (то есть определения присутствия или отсутствия генетической мутации, связанной с aHUS, в генах, кодирующих фактор комплемента H (CFH), фактор I (CFI), фактор В (CFB), мембранный кофакторный белок CD46, С3, белок 1, сходный с комплементом фактора H (CFHR1), или THBD (кодирующий антикоагулянтный белок тромбодулин) или белок 3, сходный с комплементом фактора H (CFHR3), или белок 4, сходный с комплементом фактора H (CFHR4)), или путем секвенирования генома или ген-специфического анализа (например, анализа методом полимеразной цепной реакции (PCR)), и/или путем определения, имеет ли субъект случаи aHUS в семье. Методы генетического скрининга присутствия или отсутствия генетической мутации, связанной с aHUS, хорошо известны и описаны, например, в публикации Noris M et al. "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome", 2007 Nov 16 [Updated 2011 Mar 10]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Например, общая частота проявления гена при заболевании, при котором происходят мутации фактора комплемента H (CFH), составляет 48%, а проявление гена для мутаций в CD46 составляет 53%, для мутаций в CFI составляет 50%, для мутаций в C3 составляет 56% и для мутаций в THBD составляет 64% (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). Как описано в упомянутой выше публикации Caprioli et al., (2006), у значительного числа индивидуумов с мутацией в факторе комплемента H (CFH) никогда не развивается aHUS, и высказано предположение, что субоптимальная CFH активность у этих индивидуумов является достаточной для защиты организма от эффектов активации комплемента в физиологических условиях, однако, субоптимальная CFH активность является недостаточной для предотвращения отложения C3b на клетках эндотелия сосудов при воздействии средства, которое активирует комплемент, продуцирующий более высокие количества C3b, чем нормальные.

Соответственно, в одном варианте осуществления, предлагается способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от не зависящего от фактора H атипичного гемолитического уремического синдрома или подверженного риску развития независимого от фактора H атипичного гемолитического уремического синдрома, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В другом варианте осуществления, предлагается способ ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, подверженного риску развития фактор H-зависимого атипичного гемолитического уремического синдрома, включающий периодическое обследование субъекта с целью определения наличия или отсутствия у него анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина, и лечение с помощью MASP-2 ингибирующего средства после определения наличия анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина. В другом варианте осуществления, предлагается способ снижения вероятности того, что субъект, подверженный риску развития фактор H-зависимого aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий введение MASP-2 ингибирующего средства до, или во время, или после события, по поводу которого известно, что оно связано с инициированием aHUS клинических симптомов, например, продолжительного воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, повреждения, трансплантации органа или ткани, и беременности.

В одном варианте осуществления предлагается способ снижения вероятности того, что субъект, подверженный риску развития aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий периодическое обследование субъекта с целью определения наличия или отсутствия у него анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина, и лечение с помощью MASP-2 ингибирующего средства после определения наличия анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина.

В другом варианте осуществления, предлагается способ снижения вероятности того, что субъект, подверженный риску развития aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий введение MASP-2 ингибирующего средства до, или во время, или после события, по поводу которого известно, что оно связано с инициированием клинических симптомов aHUS, например, продолжительного воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, повреждения, трансплантации органа или ткани, или беременности.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят в течение по меньшей мере одного, двух, трех, четырех дней или более до, во время, или после события, связанного с инициированием клинических симптомов aHUS, и введение может быть повторено по решению лечащего врача до тех пор, пока болезненное состояние не будет устранено или не будет находиться под контролем. В условиях, предшествующих возникновению aHUS, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения.

В некоторых вариантах осуществления на фоне первичного диагноза aHUS или в случае субъекта, проявляющего один или более симптомов, соответствующих диагнозу aHUS (например, наличие анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности), субъекта подвергают лечению с помощью эффек-

тивного количества MASP-2 ингибирующего средства (например, антитела против MASP-2) в качестве терапии первой линии без применения метода плазмафереза или в комбинации с плазмаферезом. В качестве терапии первой линии, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без применения метода плазмафереза, для того чтобы избежать возможных осложнений, возникающих при плазмаферезе, включающих геморрагию, инфекцию и подверженность воздействию нарушений и/или аллергии, присущих донору плазмы, или же когда у субъекта имеются противопоказания к использованию плазмафереза, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту, страдающему от aHUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере, в течение от одного дня до одной недели или двух недель), затем введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в течение длительного времени, по меньшей мере, в течение двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения метода плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до лечения, и, необязательно, во время лечения, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или по сравнению со здоровым субъектом, взятым для контроля, является указанием на необходимость продолжения лечения с помощью MASP-2 ингибирующего средства.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитело против MASP-2, субъекту, страдающему от aHUS или подверженному риску развития aHUS, или внутривенно, внутримышечно, или, предпочтительно, подкожно. Лечение может быть длительным, и введение может проводиться от одного раза в сутки до одного раза в месяц, но, предпочтительно, раз в две недели. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

HUS.

Так же как в случае атипичного HUS, типичная форма HUS проявляется в виде клинической картины и данных лабораторных исследований, характерных для тромботической микроангиопатии (ТМА). Однако, типичная форма HUS часто является педиатрическим заболеванием и обычно не имеет наследственного компонента или прямой связи с мутациями в генах комплемента. Этиология типичной формы HUS тесно связана с инфицированием конкретными кишечными патогенными микроорганизмами. У пациентов обычно обнаруживается острая почечная недостаточность, гемоглобинурия и тромбоцитопения, которые обычно сопровождается приступом геморрагической диареи. Это состояние вызывается кишечным инфицированием дизентерийной палочкой, сальмонеллой или токсином Шига, продуцирующим энтерогеморрагические штампы кишечной палочки, такие как E.Coli 0157:H7. Патогены попадают из загрязненных продуктов питания или источников воды. HUS является состоянием, представляющим опасность для жизни, летальностью при котором составляет 5-10%. У значительной части выживших пациентов развивается хроническое заболевание почек (Corrigan and Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11):365-9 (2011)), и может возникать необходимость в пересадке почки.

Микрососудистая коагуляция при типичной форме HUS возникает преимущественно, хотя и не исключительно, в микроциркуляторном русле почек. Лежащая в основе патофизиология опосредована токсином Шига (STX). Выделяемый энтеропатическими микробами в просвет кишечника STX преодолевает кишечный барьер, проникает в кровоток и связывается с клетками эндотелия сосудов через глоботриозил церамидный рецептор CD77 (Boyd and Lingwood *Nephron* 51:207 (1989)), который преимущественно экспрессируется на гломерулярном эндотелии и опосредует токсическое действие STX.

После связывания с эндотелием, STX индуцирует ряд событий, которые повреждают эндотелий сосудов, активируют лейкоциты и вызывают vWF-зависимое тромбообразование (Forsyth et al., *Lancet* 2: 411-414 (1989); Zoja et al., *Kidney Int.* 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., *J. Immunol.* 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., *Blood* 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., *Infect. Immun.*, 73: 8306-8316 (2005)). Эти микротромбы приводят к обструкции или окклюзии артериол и капилляров почек и других органов. Обструкция тока крови в артериолах и капиллярах микротромбами повышает силу сдвига, действующую на эритроциты при их прохождении через суженные кровеносные сосуды. Это может приводить к разрушению эритроцитов под действием силы сдвига и к образованию фрагментов эритроцитов, называемых шизоцитами. Присутствие шизоцитов является характерным показателем при HUS. Этот механизм известен как микроангиопатический гемолиз. Кроме того, обструкция тока крови приводит к ишемии, инициирующей комплемент-опосредованный воспалительный ответ, который вызывает дополнительное повреждение пораженного органа.

Лектиновый путь комплемента способствует патогенезу HUS на основе двух основных механизмов:

- 1) MASP-2-опосредованная прямая активация коагулирующей системы, вызванная повреждением эндо-

теля, и 2) лектин-опосредованная последующая активация комплемента, индуцируемая ишемией, являющейся результатом изначальной окклюзии микроваскулярного кровотока.

STX повреждает микроклетки эндотелия сосудов, и известно, что поврежденные эндотелиальные клетки активируют систему комплемента. Как уже подробно обсуждалось выше, активация комплемента после повреждения эндотелиальных клеток обусловлена преимущественно лектиновым путем. Клетки эндотелия сосудов человека, подвергнутые окислительному стрессу, отвечают экспрессированием поверхностных фрагментов, которые связывают лектины и активируют лектиновый путь комплемента (Collard et al., *Am J Pathol.* 156 (5):1549-56 (2000)). Васкулярное повреждение в результате ишемии/реперфузии также активирует комплемент по лектиновому пути *in vivo* (Scand J Immunol 61(5): 426-34 (2005)). Активация лектинового пути в этих условиях имеет патологические последствия для организма-хозяина, и ингибирование лектинового пути в результате блокирования MASP-2 предотвращает последующее повреждение ткани организма-хозяина и неблагоприятные исходы (Schwaebler et al., *PNAS* (2011)). Было показано, что помимо активации комплемента, лектин-зависимая активация MASP-2 приводит к расщеплению протромбина с образованием тромбина и к промотированию коагуляции. Таким образом, активация лектинового пути комплемента поврежденными эндотелиальными клетками может непосредственно активировать коагулирующую систему. Поэтому, лектиновый путь комплемента посредством MASP-2-опосредованной активации протромбина является, по-видимому, доминантным молекулярным путем, связывающим исходное эндотелиальное повреждение, вызванное STX, с коагуляцией и микроваскулярным тромбозом, который возникает при HUS. В силу этого, можно ожидать, что ингибиторы лектинового пути, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, будут предотвращать или уменьшать микрососудистую коагуляцию, тромбоз и гемолиз у пациентов, страдающих от HUS. И действительно, введение антитела против MASP-2 эффективно защищает мышей в экспериментальной модели типичной формы HUS. Как описано в примере 36 и показано на фиг. 45, у всех контрольных мышей, подвергавшихся воздействию STX и LPS, развивалась тяжелая форма HUS, и у мышей наступала агония или они умирали в течение 48 ч. С другой стороны, как далее показано на фиг. 45, все мыши, которые были подвергнуты лечению антителом против MASP-2 и затем подвергнуты воздействию STX и LPS, выживали (точный критерий Фишера $p < 0,01$; $N=5$). Таким образом, анти-MASP-2 терапия обеспечивает эффективную защиту мышам в этой экспериментальной модели HUS. Предполагается, что введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитело против MASP-2, будет эффективным при лечении пациентов с HUS и обеспечит защиту от микрососудистой коагуляции, тромбоза и гемолиза, вызванного инфицированием энтеропатической кишечной палочкой или другими STX-продуцирующими патогенами.

Наряду с тем, что проиллюстрировано в изобретении относительно HUS, вызванного STX, предполагается, что анти-MASP-2 терапия будет также давать положительные результаты в случае HUS-подобных синдромов, обусловленных эндотелиальным повреждением, вызванным другими токсичными средствами. Они включают такие средства, как митомицин, тиклопидин, цисплатин, хинин, циклоспорин, блеомицин, а также другие химиотерапевтические лекарственные средства и иммуносупрессивные лекарственные средства. Таким образом, предполагается, что терапия с применением антитела против MASP-2 или других способов воздействия, которые ингибируют активность MASP-2, будет эффективно предотвращать или ограничивать коагуляцию, тромбообразование и разрушение эритроцитов и предотвращать почечную недостаточность при HUS и при других родственных с TMA заболеваниях (то есть aHUS и TTP).

У пациентов, страдающих от HUS, часто проявляется диарея и рвота, количество тромбоцитов у них обычно снижено (тромбоцитопения), также снижено и количество эритроцитов (анемия). Фаза предшествующей HUS диареи обычно длится в течение приблизительно четырех дней, во время которой у субъектов, подверженных риску развития HUS, обычно проявляются один или более из следующих симптомов помимо тяжелой формы диареи: уровень гематокрита ниже 30% с доказательством интраваскулярного разрушения эритроцитов при исследовании мазка, тромбоцитопения (количество тромбоцитов $< 150 \times 10^3/\text{мм}^3$) и/или наличие нарушенной функции почек (концентрация креатинина в сыворотке выше верхнего предела референсного диапазона для данного возраста). Наличие олигоанурии (диурез $\leq 0,5$ мл/кг/час в течение > 1 дня) может быть использовано в качестве меры оценки прогресса развития HUS

(см. C. Hickey et al., *Arch Pediatr Adolesc Med* 165(10):884-889 (2011)). Обычно проводят исследование на наличие инфицирования бактериями кишечной палочки (*E.coli* 0157:H7) или представителями шигелл или сальмонелл. Для субъекта с положительным результатом исследования на инфицирование энтерогенной кишечной палочкой (например, *E. coli* 0157:H7) противопоказано применение антибиотиков, так как использование антибиотиков может повышать риск развития HUS в результате повышенной продукции STX (см. Wong C. et al., *N Engl J. Med* 342:1930-1936 (2000)). Для субъектов с положительным результатом исследования на присутствие шигелл или сальмонелл, антибиотики обычно применяют для устранения инфекции. Другая общепринятая терапия первой линии для HUS включает расширение объема, диализ и плазмоферез.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления, в случае субъекта, страдающего от одного или более симптомов, связанных с предшествующей HUS фазой, и подверженно-го риску развития HUS (то есть у субъекта проявляются один или более из следующих симптомов: диарея, уровень гематокрита ниже 30% с доказательством интраваскулярного разрушения эритроцитов при исследовании мазка, тромбоцитопения (количество тромбоцитов $< 150 \times 10^3/\text{мм}^3$) и/или наличие нарушенной функции почек (концентрация креатинина в сыворотке выше верхнего предела референсного диапазона для данного возраста)), предлагается способ снижения риска развития HUS или снижение вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение количества MASP-2 ингибирующего средства в течение периода времени, эффективного для улучшения или предотвращения нарушения функции почек. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят в течение периода времени по меньшей мере одного, двух, трех, четырех или более дней, и введение может быть повторено по решению лечащего врача до тех пор, пока болезненное состояние не будет устранено или не будет находиться под контролем. В случае предшествующей HUS фазы, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения.

Лечение инфекции *E. coli* 0157:H7 с помощью бактерицидных антибиотиков, в частности, β -лактамов, было связано с повышенным риском развития HUS (Smith et al., *Pediatr Infect Dis J* 31(1):37-41 (2012)). В некоторых вариантах осуществления в случае субъекта, страдающего от симптомов, связанных с предшествующей HUS фазой, когда по поводу субъекта известно, что он инфицирован энтерогенной кишечной палочкой и применение антибиотиков противопоказано (например, *E. coli* 0157:H7), предлагается способ снижения риска развития HUS или снижения вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение количества MASP-2 ингибирующего средства в течение первого периода времени, эффективного для ингибирования или предотвращения возникновения олигоанурии у субъекта (например, по меньшей мере, в течение одного, двух, трех или четырех дней), где введение MASP-2 ингибирующего средства в течение первого периода времени осуществляют в отсутствие антибиотика. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту в комбинации с антибиотиком в течение второго периода времени (например, по меньшей мере, в течение от одной до двух недель).

В других вариантах осуществления, в случае субъекта, страдающего от симптомов, связанных с предшествующей HUS фазой, когда по поводу субъекта известно, что он инфицирован шигеллой или сальмонеллой, предлагается способ снижения риска развития HUS или снижения вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение количества MASP-2 ингибирующего средства в течение периода времени, эффективного для ингибирования или предотвращения возникновения олигоанурии у субъекта, где введение MASP-2 ингибирующего средства осуществляют или в присутствии, или в отсутствии подходящего антибиотика.

В некоторых вариантах осуществления в случае первичного диагноза HUS или в случае проявления у субъекта одного или более симптомов, указывающих на диагноз HUS (например, наличие почечной недостаточности или микроангиопатической гемолитической анемии в отсутствие низкого фибриногена или тромбоцитопении), субъекта подвергают лечению эффективным количеством MASP-2 ингибирующего средства (например, антитело против MASP-2) в качестве терапии первой линии без применения метода плазмафереза или в комбинации с плазмаферезом. В качестве терапии первой линии, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без применения метода плазмафереза, для того чтобы избежать возможных осложнений, возникающих при плазмаферезе, включающих геморрагию, инфекцию и подверженность воздействию нарушений и/или аллергии, присущих донору плазмы, или же когда у субъекта имеются противопоказания к использованию плазмафереза, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту, страдающему от HUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, в течение острой фазы, продолжающейся по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель) затем введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в течение длительного времени, по меньшей мере, в течение двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения метода плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до лечения, и, необязательно, во время лечения, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или по сравнению со здоровым субъектом, взятым для контроля, является указанием на необходимость лечения, и где обнаружение нормального уровня указывает на улучшение.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средст-

ва, такого как антитело против MASP-2, субъекту, страдающему от HUS или подверженному риску развития HUS, или подкожно, или внутривенно. Лечение предпочтительно проводить ежедневно, но оно также может проводиться с частотой один раз в неделю или один раз месяц. Лечение может продолжаться в течение по меньшей мере от одной недели до 3 месяцев. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

ТТР.

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТР) является опасным для жизни заболеванием коагулирующей системы крови, вызываемым аутоиммунными или наследственными нарушениями, которые активируют коагулирующую систему или систему комплемента (George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35 (2006)). Это приводит к образованию многочисленных микроскопических тромбов или к тромбозам в мелких кровеносных сосудах по всему организму. Эритроциты подвергаются воздействию напряжения сдвига, которое разрушает их мембраны, приводя к внутрисосудистому гемолизу. Обусловленное этим снижение кровотока и эндотелиальное повреждение вызывают повреждение органа, включая головной мозг, сердце и почки. ТТР клинически характеризуется тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией, неврологическими изменениями, почечной недостаточностью и лихорадкой. Во времена, когда еще не применялось замещение плазмы, частота фатальных исходов при острых приступах составляла 90%. Даже с применением замещения плазмы, выживаемость в первые шесть месяцев составляет приблизительно 80%.

ТТР возникает в результате генетического и приобретенного ингибирования фермента ADAMTS-13, металлопротеазы, ответственной за расщепления крупных мультимеров фактора фон Виллебранда (vWF) на более мелкие фрагменты. Ингибирование или дефицит ADAMTS-13 в конечном счете приводит к повышенной коагуляции (Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13 регулирует активность vWF; в его отсутствии, vWF образует крупные мультимеры, которые, вероятнее всего, связывают тромбоциты и провоцирует у пациентов агрегацию тромбоцитов и тромбоз в микроциркуляторном русле.

Синдром Апшо-Шульмана (USS, также описываемый как врожденная ТТР) представляет собой врожденную недостаточность активности ADAMTS13 вследствие генных мутаций ADAMTS13 (Schulman et al., *Blood*, 16 (1): 943-57, 1960; Upshaw et al., *New Engl. J. Med*, 298 (24):1350-2, 1978). Многочисленные мутации в ADAMTS13 были выявлены у индивидуумов с врожденной ТТР (Kinoshita et al., *International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy et al., *Nature*, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., *PNAS* 99 (18):11902-11907 (2002); Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., *Blood*, 103:1305-1310 (2004) and Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008)). Субъекты с USS обычно имеют активность 5-10% от нормальной активности ADAMTS13 (Kokame et al., *PNAS* 99(18):11902-11907, 2002). Несмотря на то что приобретенные ТТР и USS имеют некоторые сходства, USS имеет некоторые важные отличия в клинических признаках. USS обычно проявляется в младенческом или детском возрасте и характеризуется тяжелой формой гипербилирубинемии с отрицательным результатом теста Кумбса вскоре после рождения, клиническим улучшением при инфузии свежей плазмы и частыми рецидивами (Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451, 2003). В некоторых случаях, пациенты с этой врожденной недостаточностью ADAMTS13 имеют слабовыраженный фенотип при рождении, и у них только развиваются симптомы, связанные с ТТР, в клинических ситуациях с повышенными уровнями фактора фон Виллебранда, таких как инфекция или беременность. Например, в публикации Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754, 2008 сообщалось о 9 японских женщинах из 6 семей с генетически подтвержденным USS, у которых было диагностировано это нарушение во время их первой беременности. Тромбоцитопения возникала в период от второго до третьего триместров в каждой из этих 15 беременностей, часто после ТТР. Было обнаружено, что все эти женщины характеризуются значительной недостаточностью активности ADAMTS13.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления, в случае субъекта с синдромом Апшо-Шульмана (USS) (то есть в случае субъекта, по поводу которого известно, что у него выявлена недостаточность активности ADAMTS13, и/или субъекта, по поводу которого известно, что у него выявлены одна или более генных мутаций ADAMTS13), предлагается способ снижения вероятности развития клинических симптомов, связанных с врожденной ТТР (например, тромбоцитопенией, анемией, лихорадкой, и/или почечной недостаточности), включающий введение количества MASP-2 ингибирующего средства (например, антитела против MASP-2) в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения одного или более клинических симптомов, связанных с ТТР. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию определения, подвержен ли субъект риску развития симптомов, связанных с врожденной ТТР, до начала проявления любых симптомов, связанных с ТТР, или после начала проявления по меньшей мере одного или более симптомов, указывающих на наличие ТТР (например, наличие анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности). Определение подверженности субъекта риску развития симптомов, связанных с врожденной ТТР (то есть наличия у субъекта USS), включает определение, имеет ли субъект мутацию в гене, кодирующем ADAMTS13, и/или определение, имеет ли субъект недостаточность активности ADAMTS13, и/или определение, имеет ли субъект случаи заболевания USS в семье. Методы генетического скрининга на присут-

ствие или отсутствие генетической мутации, связанной с USS, являются хорошо известными, например, смотрите публикации Kinoshita et al., *International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy et al., *Nature*, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., *PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., *Blood*, 103:1305-1310 (2004) and Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008).

В одном варианте осуществления предлагается способ снижения вероятности того, что субъект, у которого диагностирован USS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с ТТР, включающий периодическое обследование субъекта с целью определения наличия или отсутствия у него анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина, и лечение с помощью MASP-2 ингибирующего средства (например, антитела против MASP-2) после обнаружения наличия анемии, тромбоцитопении или повышения креатинина, или после события, по поводу которого известно, что оно связано с иницированием клинических симптомов ТТР, например, продолжительного воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, повреждения, трансплантации или беременности.

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

Развитие ТТР может быть также вызвано аутоантителом против ADAMTS-13. Кроме того, ТТР может возникать при раке молочной железы, раке желудочно-кишечного тракта или раке предстательной железы (George JN., *Oncology (Williston Park)*. 25:908-14 (2011)), при беременности (во втором триместре или после родов), George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344 (2003)), или может быть связана с заболеваниями, такими как СПИД, или аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol*.22:355-8 (2003)). ТТР может быть также вызвана применением конкретных лекарственных средств, в том числе гепарина, хинина, иммуно-опосредованного ингредиента, химиотерапевтических противораковых средств (блеомицина, цисплатина, цитозина арабинозида, дауномицина, гемцитабина, митомицина С и тамоксифена), циклоспорина А, пероральных контрацептивов, пенициллина, рифампина и антиагрегантных лекарственных средств, в том числе тиклопидина и клопидогрела (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci.*, 16: 353-357 (2011)). Другие факторы или состояния, связанные с ТТР, представляют собой токсины, такие как пчелиный яд, сепсис, секвестрацию селезенки, трансплантацию, васкулит, сосудистую хирургию и инфекции, такие как стрептококковые пневмонии и генерализованная цитомегалия (Moake JL., *N Engl J Med.*, 347:589-600 (2002)). ТТР, обусловленная транзиторной функциональной недостаточностью ADAMTS-13, может возникать в результате повреждения эндотелиальных клеток, связанного с пневмококковой инфекцией (*Pediatr Nephrol.*, 26:631-5 (2011)).

Замещение плазмы является стандартным подходом при лечении ТТР (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397 (1991)). Замещение плазмы восстанавливает активность ADAMTS-13 у пациентов с генетическими дефектами и удаляет ADAMTS-13 аутоантитела у пациентов с приобретенной аутоиммунной ТТР (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am.*, 21(4): 609-v (2007)). Обычно при этой терапии используют дополнительные лекарственные средства, такие как иммунодепрессанты (George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35 (2006)). Однако, замещение плазмы не дает положительного результата у 20% пациентов, рецидив возникает у более чем трети пациентов, и плазмаферез является дорогим лечением и требует специального оборудования. Кроме того, многие пациенты не могут переносить замещение плазмы. Поэтому, сохраняется острая потребность в дополнительных и усовершенствованных методах лечения ТТР.

Так как ТТР представляет собой нарушение системы коагуляции крови, лечение с помощью антагонистов системы комплемента может способствовать стабилизации и коррекции заболевания. В то время как патологическая активация альтернативного пути комплемента связана с aHUS, роль активации комплемента при ТТР является менее очевидной. Функциональная недостаточность ADAMTS13 имеет большое значение с точки зрения предрасположенности к ТТР, однако, но она не объясняет причину возникновения острых приступов. Факторы воздействия окружающей среды и/или другие генетические изменения могут способствовать проявлению ТТР. Например, гены, кодирующие белки, вовлеченные в регуляцию системы коагуляции, vWF, тромбоцитарной функции, компонентов поверхности эндотелия сосудов или системы комплемента, могут быть непосредственно связаны с развитием острой тромбоцитарной микроангиопатии (Galbusera, M. et al., *Haematologica*, 94: 166-170 (2009)). В частности, было показано, что важную роль играет активация комплемента; было показано, что сыворотка при тромбоцитарной микроангиопатии, связанной с недостаточностью ADAMTS-13, вызывает отложение C3 и MAC и последующую активацию нейтрофилов, которая могла бы быть прекращена путем инактивации комплемента (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52 (2005)). Кроме того, недавно было показано, что во время острых приступов ТТР повышаются уровни C4d, C3bBbP и C3a (M. Reti et al., *J Thromb Haemost*. Feb 28. (2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [скоро выйдет электронная публикация]), что соответствует активации классического/лектинового и альтернативного путей. Это повышенное количество активации комплемента при острых приступах может инициировать конечный путь активации и может быть ответственным за последующее обострение ТТР.

Очевидно, что роль ADAMTS-13 и vWF при TTP заключается в активации и агрегации тромбоцитов и их последующем участии в напряжении сдвига и отложении при микроангиопатиях. Активированные тромбоциты взаимодействуют как с классическим, так и с альтернативным путями комплемента и инициируют их. Опосредованная тромбоцитами активация комплемента увеличивает количество медиаторов воспаления C3a и C5a (Peerschke E et al., *Mol Immunol*, 47:2170-5 (2010)). Таким образом, тромбоциты могут служить в качестве мишеней классической активации комплемента при наследственной или аутоиммунной TTP.

Как описано выше, лектиновый путь комплемента посредством MASP-2 опосредованной активации протромбина является доминантным молекулярным путем, связывающим эндотелиальное повреждение с коагуляцией и микроваскулярным тромбозом, который возникает при HUS. Аналогично, активация лектинового пути комплемента может непосредственно запускать коагулирующую систему при TTP. Активация лектинового пути может быть инициирована в ответ на исходное повреждение эндотелия, вызванное недостаточностью ADAMTS-13 при TTP. Поэтому, можно ожидать, что ингибиторы лектинового пути, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, будут облегчать состояния микроангиопатии, связанные с микрососудистой коагуляцией, тромбозом и гемолизом у пациентов, страдающих от TTP.

Пациенты, страдающие от TTP, обычно находятся в отделении экстренной медицинской помощи с одним или более из следующих диагнозов: пурпура, почечная недостаточность, низкие тромбоциты, анемия и/или тромбоз, включая инсульт. Современный стандартный способ лечения TTP включает доставку через катетер (например, через внутривенный или другие формы катетера) подвергнутой плазмозферезу плазмы в течение двух недель или более, обычно, три раза в неделю, но вплоть до раза в сутки. Если результаты исследования субъекта указывают на присутствие ингибитора ADAMTS13 (то есть эндогенного антитела против ADAMTS13), то тогда плазмозферез может проводиться в комбинации с иммуносупрессивной терапией (например, с кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином). В случае субъектов с рефракторной TTP (приблизительно 20% пациентов с TTP), лечение, по меньшей мере, в течение двух недель методом плазмозфереза не дает положительных результатов.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, в случае первичного диагноза TTP у субъекта или проявления у него одного или более симптомов, указывающих на TTP (например, поражение центральной нервной системы, тяжелая форма тромбоцитопении (количество тромбоцитов меньше чем или равно 5000/мкл без приема аспирина, меньше чем или равно 200000/мкл при приеме аспирина), тяжелая форма поражения сердца, тяжелая форма поражения легких, инфаркт желудочно-кишечного тракта или гангрены), предлагается способ лечения субъекта с помощью эффективного количества MASP-2 ингибирующего средства (например, антитела против MASP-2) в качестве терапии первой линии без применения метода плазмозфереза или в комбинации с плазмозферезом. В качестве терапии первой линии, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без применения метода плазмозфереза, для того чтобы избежать возможных осложнений, возникающих при плазмозферезе, включающих геморрагию, инфекцию и подверженность воздействию нарушений и/или аллергии, присущих донору плазмы, или же когда у субъекта имеются противопоказания к использованию плазмозфереза, или в условиях, когда плазмозферез недоступен. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство вводят субъекту, страдающему от TTP, в комбинации (в том числе при совместном введении) с иммунодепрессантом (например, например, с кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином) и/или в комбинации с концентрированной ADAMTS-13.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту, страдающему от TTP, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, в период острой фазы, продолжающегося по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель), затем введение MASP-2 ингибирующего средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в период хронической фазы по меньшей мере две недели или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения метода плазмозфереза. В некоторых вариантах осуществления способ применяют для поддержания субъекта, для того чтобы не допустить страдания субъекта от одного или более симптомов, связанных с TTP.

В другом варианте осуществления, предлагается способ лечения субъекта, страдающего от рефракторной TTP (то есть субъекта, лечение которого в течение по меньшей мере двух недель методом плазмозфереза не дало положительных результатов), путем введения количества ингибитора MASP-2, эффективного для облегчения одного или более симптомов TTP. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 (например, антитело против MASP-2) вводят субъекту с рефракторной TTP на длительной основе в течение периода времени по меньшей мере двух недель или более, подкожно или другим способом парентерального введения. Введение может быть проведено повторно по решению лечащего врача до тех пор, пока болезненное состояние не будет устранено или не будет находиться под контролем.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до лечения и, необязательно, во время лечения, где обнаружение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или по сравнению со здоровым субъектом, взятым для контроля, является указанием на необходимость продолжения лечения с помощью MASP-2 ингибирующего средства.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитело против MASP-2, субъекту, страдающему от ТТР или подверженному риску развития ТТР, или подкожно, или внутривенно. Лечение предпочтительно проводить ежедневно, но оно может проводиться и с частотой один раз в две недели. Лечение продолжают до тех пор, пока количество тромбоцитов у субъекта не достигнет более 150000/мл в течение по меньшей мере двух последующих дней. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от ТТР, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от ТТР, на уровне по меньшей мере на 20% или более (например по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) больше, чем ингибирующее действие на отложение C5b-9 в сыворотке крови.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента с ТТР, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95 до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТТР, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по

меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70.

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

Болезнь Дегоса.

Болезнь Дегоса, известная также как злокачественный атрофический папулез, является очень редкой ТМА, поражающей эндотелий мелких сосудов кожи, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы. Эта васкулопатия вызывает окклюзию венул и артериол, приводящую к повреждению кожи, ишемии кишечника и нарушениям центральной нервной системы, включая инсульты, эпилепсию и когнитивные расстройства. В случае кожи, некроз соединительной ткани обусловлен тромботической окклюзией мелких артерий. Однако, причина болезни Дегоса неизвестна. С ней связывали васкулит, коагулопатию или первичную дисфункцию эндотелиальных клеток. Болезнь Дегоса характеризуется 50% выживаемостью в течение от двух до трех лет. Эффективного лечения для болезни Дегоса не существует, но для облегчения симптомов используют антиагрегантные лекарственные средства, антикоагулянты и иммунодепрессанты.

Несмотря на то что механизм болезни Дегоса неизвестен, тем не менее, ее связывали с путем активации комплемента. В публикации Margo et al., *Am J Clin Pathol* 135 (4):599-610, 2011) сообщалось об идентификации выраженных отложений C5b-9 в коже, желудочно-кишечном тракте и сосудах головного мозга у четырех больных с болезнью Дегоса в терминальной стадии. Эксперименты по лечению экулизумабом давали эффект на начальном этапе при лечении кожных и кишечных повреждений, но не предотвращали развития системного заболевания (см. публикации Garrett-Bakelman F. et al., "C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab" (Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster #156; and Polito J. et al., "Early detection of systemic Degos disease (DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival" (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster #1205).

Многие пациенты, страдающие от болезни Дегоса, имеют нарушения коагуляции крови. Для этой болезни характерна тромботическая окклюзия мелких артерий кожи. В силу того, что при этом заболевании вовлечен путь комплемента, как это описано для других ТМА, предполагается, что ингибиторы лектинового пути, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, могут приводить к положительным результатам при лечении пациентов, страдающих от болезни Дегоса.

Соответственно, в другом варианте осуществления, в изобретении предлагаются способы лечения болезни Дегоса путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитела против MASP-2, в фармацевтическом носителе, субъекту, страдающему от болезни Дегоса или состояния, возникающего вследствие болезни Дегоса. MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту, страдающему от болезни Дегоса или состояния, возникающего вследствие болезни Дегоса, например, внутриартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидергических лекарственных средств. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует

альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, на уровне по меньшей мере на 20% или более (например по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) больше, чем ингибирующее действие на отложение C5b-9 в сыворотке крови.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента с болезнью Дегоса, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95 до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

Катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS).

Катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS) является экстремальным вариантом синдрома антифосфолипидных антител (APLA). CAPS характеризуется венозным и артериальным тромбозом, обусловленным патогенными антителами. CAPS представляет собой ТМА с множественным тромбозом, ишемией органа и функциональной недостаточностью органа. Так же, как и в случае других ТМА, для этого заболевания характерна окклюзия мелких сосудов в различных органах. Смертность при CAPS достигает высокого уровня порядка 50%, и часто он связан с инфекцией или травмой. Пациенты имеют антифосфолипидные антитела, обычно IgG.

Клинически, CAPS вовлекает в патологический процесс по меньшей мере три органа или ткани с

гистопатологическим доказательством окклюзии мелких сосудов. Периферический тромбоз может охватывать вены и артерии в центральной нервной системе, сердечнососудистой, почечной или легочной системах. Пациенты подвергаются лечению антибиотиками, антикоагулянтами, кортикостероидами, замещением плазмы и внутривенным иммуноглобулинами. Тем не менее, смерть может наступать в результате множественной функциональной недостаточности органов.

При CAPS вовлечен путь комплемента. Например, исследования на экспериментальных моделях на животных указывают на то, что ингибирование комплемента может быть эффективным способом предотвращения тромбоза, связанного с CAPS (Shapira L. et al., *Arthritis Rheum* 64(8):2719-23, 2012). Более того, как было дополнительно сообщено в упомянутой выше публикации, введение экулизумаба субъекту, страдающему от CAPS, в дозах, которые блокируют путь комплемента, предотвращало острые прогрессирующие тромботические осложнения и вызывало обратное развитие тромбоцитопении (см. также Lim W., *Curr Opin Hematol* 18(5):361-5, 2011). Поэтому, как описано в изобретении для других ТМА, предполагается, что ингибиторы лектинового пути, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, могут приводить к положительным результатам при лечении пациентов, страдающих от CAPS.

Соответственно, в другом варианте осуществления, в изобретении предлагаются способы лечения CAPS путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитела против MASP-2, в фармацевтическом носителе, субъекту, страдающему от CAPS или состояния, возникающего вследствие CAPS. MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту, страдающему от CAPS или состояния, возникающего вследствие CAPS, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае неопиоидных лекарственных средств. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от CAPS, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от CAPS, на уровне по меньшей мере на 20% или более (например по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) больше, чем ингибирующее действие на отложение C5b-9 в сыворотке крови.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента с CAPS, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от CAPS, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариативную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую

цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

ТМА на фоне рака.

Системные злокачественные новообразования любого типа могут приводить к клиническим и патологическим проявлениям ТМА (см. например, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007). ТМА на фоне рака часто обнаруживают в легких и, по-видимому, она связана с опухолевыми эмболами (Francis KK et al., Commun Oncol 2:339-43, 2005). Опухолевые эмболы могут снижать кровоток и, следовательно, приводить к состоянию гипоперфузии в пораженных артериолах и венах. Предполагается, что возникающий в связи с этим стресс и повреждение ткани локализовано активирует лектиновый путь комплемента. Активированный лектиновый путь, в свою очередь, может активировать систему коагуляции посредством MASP-2 зависимого расщепления протромбина до тромбина, что приводит к протромбическому состоянию, характерному для ТМА.

Предполагается, что ингибирование MASP-2 в этих условиях понизит локализованную активацию тромбина и тем самым облегчит протромбическое состояние.

Поэтому, как описано в изобретении для других ТМА, предполагается, что ингибиторы лектинового пути, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, могут приводить к положительным результатам при лечении пациентов, страдающих от ТМА на фоне рака.

Соответственно, в другом варианте осуществления, в изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения ТМА на фоне рака путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитела против MASP-2, в фармацевтическом носителе, субъекту, страдающему от ТМА на фоне рака или подверженному риску развития ТМА на фоне рака. MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту, страдающему от ТМА на фоне рака или подверженному риску развития ТМА на фоне рака, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидергических лекарственных средств. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует

альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от ТМА на фоне рака, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95 до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента, страдающего от ТМА на фоне рака, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТМА на фоне рака, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

ТМА на фоне противораковой химиотерапии.

ТМА, связанная с химиотерапией, представляет собой состояние, включающее тромбоцитопению, микроангиопатическую гемолитическую анемию и почечную дисфункцию, которое развивается у 2-10% пациентов с анамнезом злокачественных новообразований, подвергаемых лечению химиотерапевтическими средствами, таких как гемцитабин, митомицин, оксалиплатин и другие подобные средства. ТМА, связанная с химиотерапией, характеризуется неудовлетворительными клиническими результатами с высокой смертностью (см. например, Blake-Haskins et al., Clin Cancer Res 17 (18):5858-5866, 2011).

Считают, что этиология связанной с химиотерапией ТМА включает в себя неспецифическое токсическое повреждение эндотелия микрососудов. На экспериментальной модели митомицин-индуцируемой ТМА на животных было продемонстрировано прямое повреждение эндотелиальных клеток (Dlott J. et al., Ther Apher Dial 8:102-111, 2004). Было показано, что повреждение эндотелиальных клеток с помощью ряда механизмов активирует лектиновый путь комплемента. Например, в публикации Stahl et al. было показано, что эндотелиальные клетки, подвергаемые воздействию окислительного стресса, активируют

лектиновый путь комплемента как *in vitro*, так и *in vivo* (Collard et al., Am J Pathol. 156 (5):1549-56, 2000; La Bonte et al., J Immunol. 15; 188(2):885-91, 2012). *In vivo*, этот процесс приводит к тромбозу, и было показано, что ингибирование лектинового пути предотвращает тромбоз (La Bonte et al. J Immunol. 15; 188(2):885-91, 2012). Кроме того, как проиллюстрировано в изобретении в примерах 37-39, на экспериментальной модели ТМА на мышцах, в которой использовали локализованное фотовозбуждение FITC-Dex для индуцирования локализованного повреждения микроциркуляторного русла с последующим развитием ответной реакции в форме ТМА, авторы настоящего изобретения показали, что ингибирование MASP-2 может предотвращать ТМА. Таким образом, повреждение эндотелия микрососудов химиотерапевтическими лекарственными средствами может активировать лектиновый путь комплемента, который затем приводит к локализованному протромботическому состоянию и способствует развитию ответной реакции в форме ТМА. Так как активация лектинового пути и возникновение протромботического состояния зависит от MASP-2, то предполагается, что ингибиторы MASP-2, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, могут уменьшать развитие ответной реакции в форме ТМА и снижать риск возникновения ТМА на фоне противораковой химиотерапии.

Соответственно, в другом варианте осуществления, в изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения ТМА на фоне противораковой химиотерапии путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитела против MASP-2, в фармацевтическом носителе, субъекту, страдающему от ТМА на фоне противораковой химиотерапии или подверженному риску развития ТМА на фоне противораковой химиотерапии. MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту, который был подвергнут, подвергается в данный момент или будет подвергаться химиотерапии, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидергических лекарственных средств. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от ТМА на фоне противораковой химиотерапии, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента, страдающего от ТМА на фоне противораковой химиотерапии, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТМА на фоне противораковой химиотерапии, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последова-

тельности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

ТМА на фоне трансплантации.

ТМА, связанная с трансплантацией (ТА-ТМА), представляет собой изнуряющий симптом, который может возникать у пациентов, которым проводят трансплантацию, например, у пациентов, которым проводят трансплантацию аллогенных гематопозитических стволовых клеток (см. например, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007). Патогенез этого состояния практически не изучен, но, по-видимому, от включает в себя слияние ответных реакций, которые достигают кульминации при повреждении эндотелиальных клеток (Laskin B.L. et al., Blood 118(6):1452-62, 2011). Как было описано выше, повреждение эндотелиальных клеток является прототипным стимулом активации лектинового пути и генерации протромботических окружающих условий.

Полученные недавно данные дополнительно подтверждают роль активации комплемента по лектиновому пути в патогенезе ТА-ТМА. В публикации Laskin B.L., et al., Transplantation, 27; 96(2):217-23, 2013 было показано, что отложение C4d в ренальных артериолах в значительно большей степени обнаруживалось у субъектов с гистологической ТА-ТМА (75%), чем в контрольных группах (8%). Поэтому, C4d может быть маркером патологии ТА-ТМА, указывающим на локализованную фиксацию активации комплемента по лектиновому или классическому пути.

Так как активация лектинового пути и возникновение протромботического состояния зависит от MASP-2, то предполагается, что ингибиторы MASP-2, включающие, но этим не ограничивая, антитела, которые блокируют функцию MASP-2, могут уменьшать развитие ответной реакции в форме ТМА и снижать риск возникновения связанной с трансплантацией ТМА (ТА-ТМА).

Соответственно, в другом варианте осуществления, в изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения ТМА на фоне трансплантации путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как антитела против MASP-2, в фармацевтическом носителе, субъекту, страдающему от ТМА на фоне противораковой химиотерапии или подверженному риску развития ТМА на фоне трансплантации. MASP-2 ингибирующее средство вводят системно субъекту, который был подвергнут, подвергается в данный момент или будет подвергаться процедуре трансплантации, например, внутриартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидергических лекарственных средств. Антитело против MASP-2 может быть введено в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб. В некоторых вариантах осуществления В изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения ТМА на фоне трансплантации аллогенных стволовых клеток, включающие введение композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего средства, такого как MASP-2 ингибирующее антитело, субъекту до, во время или после проведения трансплантации аллогенных стволовых клеток.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной KD 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп CCP1 в домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* исследовании в 1% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC₅₀ 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную

молекулу, где указанное антитело является молекулой IgG2, где указанное антитело является молекулой IgG1, где указанное антитело является молекулой IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, но не затрагивает классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у субъекта, страдающего от ТМА на фоне трансплантации, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови, взятой у пациента, страдающего от ТМА на фоне трансплантации, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на величину от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, не подвергнутой лечению.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТМА на фоне трансплантации, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающей: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемой контрольным антителом OMS646, включающие вариабельную область тяжелой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, описанную в последовательности SEQ ID NO: 70.

IV. Роль masp-2 при других заболеваниях и состояниях, и терапевтические методы, в которых используются MASP-2.

Ингибирующие средства.

Заболевания почек.

Система активации комплемента вовлечена в патогенез широкого спектра заболеваний почек, включая мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (IgA-нефропатию, болезнь Берже) (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001), мембранозный гломерулонефрит (Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, RE., et al., Kidney Int., 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., Kidney Int. 35:976-84, 1989), мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (мезангиокапиллярный гломеруло-

нефрит) (Bartlow, B.G., et al. *Kidney Int.* 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., *J. Exp. Med.* 175:939-50, 1992), острый постинфекционный гломерулонефрит (постстрептококковый гломерулонефрит), криоглобулинэмический гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol.* 101:59-66, 2001), волчаночный нефрит (Gatenby, P.A. *Autoimmunity* 11:61-6, 1991) и нефрит на фоне пурпуры Шенлейн-Геноха (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000). Вовлечение комплемента при заболевании почек признается уже в течение нескольких десятилетий, однако, до настоящего времени его точная роль в возникновении, развитии и конечной фазе заболевания почек все еще является предметом широких дискуссий. В нормальных условиях, участие комплемента оказывает положительное воздействие на организм-хозяина, но неадекватная активация и отложение комплемента может приводить к повреждению тканей.

Имеется существенное доказательство, что гломерулонефрит, воспаление клубочка, часто инициируется отложением иммунных комплексов в гломерулярных или тубулярных структурах, которое затем инициирует активацию комплемента, воспаление и повреждение тканей. В публикации Kahn, T.N., et al., *Histopath.* 26:351-6, 1995 было продемонстрировано увеличенное отложение C5b-9 в базальных мембранных канальцах при биопсиях, взятых у пациентов, страдающих различными формами гломерулонефрита. В исследовании пациентов с IgA нефрологией (Alexopoulos, A., et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 10:1166-1172, 1995), отложение C5b-9 в тубулярных эпителиальных/базальных мембранных структурах коррелировало с уровнем креатинина в плазме. В другом исследовании мембранной нефропатии была продемонстрирована взаимосвязь между клиническими результатами и уровнями sC5b-9 в моче (Kon, S.P., et al., *Kidney Int.* 48:1953-58, 1995). Повышенные уровни sC5b-9 имели положительную корреляцию с неблагоприятным прогнозом. В публикации Lento, T., et al., *Kidney Int.* 47:1403-11, 1995 приведены данные по измерению повышенных уровней CD59, регуляторного фактора комплемента, который ингибирует мембраноатакующий комплекс в цитоплазматических мембранах, а также C5b-9 в моче пациентов, страдающих мембранозным гломерулонефритом. Гистопатологический анализ образцов биопсии, взятых у тех же пациентов, показал отложение белков C3 и C9 в клубочках, в то время как экспрессия CD59 в этих тканях была пониженной по сравнению с экспрессией в тканях почек в норме. Эти различные исследования позволяют предположить, что продолжительный комплемент-опосредованный гломерулонефрит приводит к выведению белков комплемента с мочой, что коррелирует со степенью поражения ткани и с прогнозом заболевания.

Ингибирование активации комплемента в различных экспериментальных моделях гломерулонефрита на животных также показало важность активации комплемента в этиологии заболевания. В модели мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита (MPGN), инфузия антисыворотки против Thy1 крысам с C6-недостаточностью (которые не способны синтезировать C5b-9) приводило к уменьшению гломерулярной клеточной пролиферации на 90%, снижению инфильтрации тромбоцитов и макрофагов на 80%, уменьшению синтеза коллагена IV типа (маркера экспансии мезангиальных матриц) и снижению протеинурии на 50% по сравнению с немутантными животными (Brandt, J., et al., *Kidney Int.* 49:335-343, 1996). Эти результаты указывают на то, что C5b-9 выполняет функцию основного медиатора при повреждении ткани комплементом в этой модели антитимоцитарной сыворотки на крысах. В другой модели гломерулонефрита, инфузия возрастающих доз кроличьей антисыворотки к крысиной клубочковой базальной мембране продуцировала зависимость от дозы миграцию полиморфноядерных лейкоцитов (PMN), которую предварительно ослабляли обработкой фактором яда кобры (для расходования комплемента) (Scandrett, A.L., et al., *Am. J. Physiol.* 268:F256-F265, 1995). Крысы, которых подвергали обработке фактором яда кобры, также характеризовались уменьшенной гистопатологией, сокращением продолжительной протеинурии и более низкими уровнями креатинина по сравнению с контрольными животными. В публикации Couser, W.G., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1888-94, 1995, при использовании трех моделей гломерулонефрита (GN) на крысах (антитимоцитарная сыворотка, конкавалин А, анти-конкавалин А и пассивный нефрит Хейманна) была продемонстрирована потенциальная терапевтическая эффективность подходов по ингибированию комплемента путем применения рекомбинантного белка sCRI. Крысы, которых подвергли обработке sCRI, характеризовались значительным уменьшением миграции полиморфноядерных лейкоцитов, тромбоцитов и макрофагов, снижением мезангиолиза и протеинурии по сравнению с контрольными животными. Дополнительное доказательство важности активации комплемента при гломерулонефрите было получено при использовании антитела MoAb против C5 в модели на мышах NZB/W F1. Антитела MoAb против C5 ингибируют расщепление C5, тем самым блокируя генерацию C5a и C5b-9. Длительная терапия с помощью антител MoAb против C5 в течение 6 месяцев давала в результате значительное улучшение протекания гломерулонефрита.

Гуманизированное моноклональное антитело MoAb против C5 (5G1.1), которое предотвращает расщепление компонента C5 комплемента человека на его провоспалительные компоненты, сейчас находится на стадии разработки компанией Alexion Pharmaceuticals, Inc., (New Haven, Connecticut) в качестве перспективного лекарственного средства для лечения гломерулонефрита.

Прямое доказательство патологической роли комплемента при повреждении почек получено при исследовании пациентов с генетически обусловленной недостаточностью специфических компонентов комплемента. В ряде публикаций было документально подтверждена связь заболевания почек с недостаточностью регуляторный фактор комплемента H (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al.,

Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., Nat. Genet. 31:424-8, 2002). Недостаточность фактора H приводит к низким уровням фактора В и С3 в плазме и расходованию C5b-9. Атипичный мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (MPGN) и идиопатический гемолитический уремический синдром (HUS) связаны с недостаточностью фактора H. Свиньи с недостаточностью фактора H (Jansen, J.H., et al., Kidney Int. 53:331-49, 1998) и нокаутные по фактору H мыши (Pickering, M.C., 2002) проявляют MPGN-подобные симптомы, что подтверждает важность фактора H в регуляции комплемента. Недостаточность других компонентов комплемента связана с заболеванием почек на фоне развития системной красной волчанки (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:261-81, 1997). Недостаточность по C1q, C4 и C2 интенсивно провоцирует развитие SLE посредством механизмов, относящихся к нарушенному выведению иммунных комплексов и апоптического материала. У многих из пациентов, страдающих SLE, возникает волчаночный нефрит, характеризующийся отложением иммунных комплексов по всему клубочку.

Дополнительное доказательство, указывающее на связь активацию комплемента с заболеванием почек, были получены при идентификации у пациентов аутоантител, направленных против компонентов комплемента, некоторые из которых были непосредственно связаны с заболеванием почек (Trouw, L.A., et al., Mol. Immunol. 38: 199-206, 2001). Число этих аутоантител коррелирует с заболеванием почек с настолько высокой степенью, что для обозначения данной активности был введен термин "нефритогенный фактор (NeF)". В клинических исследованиях, приблизительно у 50% пациентов с положительными нефритогенными факторами развивался MPGN (Spitzer, R.E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 64:177-83, 1992). C3NeF представляет собой аутоантитело, направленное против C3-конвертазы (C3bBb) альтернативного пути, и оно стабилизирует эту конвертазу, тем самым способствуя активации альтернативного пути (Dana, M.R., et al., J. Immunol. 116:1-7, 1976). Таким же образом, аутоантитело со специфичностью к C3-конвертазе (C4b2a) классического пути, называемое C4NeF, стабилизирует эту конвертазу и в результате промотирует активацию классического пути (Dana, M.R. et al., J. Immunol. 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., J. Clin. Invest. 65:1249-56, 1980). Было описано, что аутоантитела против C1q связаны с нефритом у пациентов, страдающих SLE (Hovath, L., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 19:667-72, 2001; Siegert, C., et al., J. Rheumatol. 18:230-34, 1991; Siegert, C., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10:19-23, 1992), и сообщалось, что повышение титра этих аутоантител против C1q может использоваться в качестве прогностического фактора внезапного обострения нефрита (Coremans, I.E., et al., Am. J. Kidney Dis. 26:595-601, 1995). Иммунные отложения, извлеченные из почек умерших пациентов, страдавших от SLE, обнаруживали аккумуляцию в них этих аутоантител против C1q (Mannick, M., et al., Arthritis Rheumatol. 40:1504-11, 1997). Все эти факты указывают на патологическую роль данных аутоантител. Однако не у всех пациентов с аутоантителами против C1q развивается заболевание почек, и, кроме того, некоторые здоровые индивидуумы также имеют низкий титр аутоантител против C1q (Siegert, C.E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 67:204-9, 1993).

Помимо альтернативного и классического путей активации комплемента, в заболевании почек может также играть важную патологическую роль лектиновый путь активации комплемента. Повышенные уровни MBL, MBL-ассоциированной сериновой протеазы и продуктов активации комплемента были обнаружены иммуногистохимическими методами в биоптатах почек, взятых у пациентов, страдающих рядом различных заболеваний почек, включая нефрит на фоне пурпуры Шенлейн-Геноха (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000), криоглобулемический гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., Clin. Immunol. 101:59-66, 2001) и IgA нейропатию (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001). Поэтому, несмотря на тот факт, что связь между комплементом и заболеванием почек известна уже в течение нескольких десятилетий, исследования того, как конкретно комплемент воздействует на эти заболевания почек, еще далеки от своего завершения.

Заболевания крови.

Сепсис обусловлен генерализованной реакцией пациента на инвазию микроорганизмов. Основной функцией системы комплемента является управление воспалительной реакцией на инвазивные бактерии и прочие патогены. В многочисленных исследованиях было показано, что активация комплемента занимает центральное место в патогенезе сепсиса, что согласуется с физиологической ролью комплемента (Bone, R.C., Annals. Internal. Med. 115:457-469, 1991). Определение клинических проявлений сепсиса находится еще в стадии развития. Сепсис обычно описывают как системный ответ организма-хозяина на инфекцию. Однако во многих случаях у пациентов с симптомами сепсиса не обнаруживают очевидных клинических признаков инфекции (например, положительных бактериальных гемокультур). Это противоречие впервые было вынесено на обсуждение на Конференции по достижению консенсуса в 1992, на которой был введен термин "синдром системного воспалительного ответа" (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), для которого не требовалось обнаружения наличия бактериальной инфекции (Bone, R.C., et al., Crit. Care Med. 20:724-726, 1992). В настоящее время существует общее мнение, что сепсис и SIRS сопровождаются неспособностью регулировать воспалительную реакцию. Применительно к целям этого краткого обзора, авторы избирательно считают, что клиническое определение сепсиса также включает в себя тяжелую форму сепсиса, септический шок и SIRS.

До конца 1980 годов, доминирующим источником инфекции у пациентов, страдающих от сепсиса,

являлись грамотрицательные бактерии. Было известно, что инъекция животным липополисахарида (LPS), основного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, стимулирует высвобождение медиаторов воспаления из клеток различного типа и вызывает симптомы острого инфекционного заболевания (Haeneу, M.R., et al., *Antimicrobial Chemotherapy* 41 (Suppl. A):41-6, 1998). Интересно отметить, что спектр ответственных за развитие заболевания микроорганизмов по неизвестным пока причинам явно сместился от преимущественно грамотрицательных бактерий в конце 1970-х и 1980-х годов к преимущественно грамположительным бактериям в настоящее время (Martin, G.S., et al., *N. Engl. J. Med.* 348:1546-54, 2003).

В многочисленных исследованиях была продемонстрирована важная роль активации комплемента в опосредовании воспаления и во вкладе в характерные особенности шока, в частности, септического и геморрагического шока. Септический шок обычно провоцируют как грамотрицательные, так и грамположительные микроорганизмы. LPS является потенциальным активатором комплемента, преимущественно, по альтернативному пути, хотя также возникает и классический путь активации, опосредованный антителами (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med.* 292:937-400, 1975). Основными компонентами клеточных стенок грамположительных бактерий являются пептидогликан и липотейхоевая кислота, и оба компонента являются потенциальными активаторами альтернативного пути активации комплемента, хотя при наличии специфических антител они также могут активировать и классический путь активации комплемента (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

Сначала патогенез сепсиса связывали с системой комплемента, когда исследователями было отмечено, что анафилатоксины C3a и C5a опосредуют целый ряд воспалительных реакций, которые также могут возникать при сепсисе. Эти анафилатоксины индуцируют вазодилатацию и повышение микроваскулярной проницаемости, осложнения, которые играют центральную роль при септическом шоке (Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions* 34:345-349, 1991).

Кроме того, анафилатоксины индуцируют бронхоспазм, высвобождение гистамина из мастоцитов и агрегацию тромбоцитов. Более того, они оказывают многочисленные воздействия на гранулоциты, такие как хемотаксис, агрегация, адгезия, высвобождение лизосомальных ферментов, генерация токсичного супероксид аниона и образование лейкотриенов (Shin, H.S., et al., *Science* 162:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3:177-86, 1986). Считают, что эти биологические воздействия играют некоторую роль в развитии осложнений при сепсисе, таких как шок или синдром острой дыхательной недостаточности (ARDS) (Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet* 1:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery* 99:744-50, 1986). Более того, повышенные уровни анафилатоксина C3a связаны с летальным исходом при сепсисе (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med.* 86:20-26, 1989). В некоторых экспериментальных моделях шока на животных, определенные штаммы с недостаточностью комплемента (например, штаммы с C5 недостаточностью) являются более устойчивыми к эффектам, вызываемым инфузией LPS (Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990).

Было показано, что блокирование генерации C5a с помощью антител в начале развития сепсиса у грызунов приводит к значительному повышению выживаемости (Czermak, B. J., et al., *Nat. Med.* 5:788-792, 1999). Аналогичные выводы были сделаны при блокировании рецептора C5a (C5aR) как с помощью антител, так и с помощью низкомолекулярного ингибитора ингибитором (Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J.* 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C. et al., *J. Clin. Invest.* 110:101-8, 2002). Проведенные ранее экспериментальные исследования на обезьянах позволили выдвинуть предположение о том, что блокада C5a с помощью антител облегчала септический шок, вызванный кишечной палочкой, и синдром дыхательной недостаточности у взрослых (Hangen, D.H., et al., *J. Surg. Res.* 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). У людей, страдающих сепсисом, был повышен уровень C5a, что связывали со значительным снижением уровня выживаемости вместе с мультиорганной недостаточностью по сравнению с этими показателями у пациентов с менее тяжелой формой сепсиса и выжившими пациентами (Nakae, H., et al., *Res. Commun. Spet. Pathol. Pharmacol.* 84:189-95, 1994; Nakae, et al., *Surg. Today* 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., *Arch. Surg.* 123:645-649, 1988). Механизмы, посредством которых C5a оказывает свои вредные воздействия при сепсисе, нуждаются в более подробном исследовании, однако недавно полученные данные позволяют предположить, что генерация C5a при сепсисе в значительной степени нарушает врожденные иммунные функции нейтрофилов крови (Huber-Lang, M.S., et al., *J. Immunol.* 169:3223-31, 2002), их способность вызывать рост дыхательной активности и генерировать цитокины (Riedemann, N.C., et al., *Immunity* 19:193-202, 2003). Кроме того, генерация C5a при сепсисе, по-видимому, оказывает прокоагулирующий эффект (Laudes, L.J., et al., *Am. J. Pathol.* 160:1867-75, 2002). Комплемент-модулирующий белок CI INH также продемонстрировал свою эффективность в экспериментальных моделях сепсиса и ARDS на животных (Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt.* 93:299-305, 1993).

Пектиновый путь также может играть некоторую роль в патогенезе сепсиса. Было показано, что MBL может связываться с целым рядом клинически важных микроорганизмов, включая как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, и активировать лектиновый путь (Neth, O., et al., *Infect. Immun.* (68):688, 2000). Липотейхоевую кислоту (LTA) в последнее время все чаще рассматривают в качестве грамположительного аналога LPS. Она является потенциальным иммуностимулятором, который индуцирует высвобождение цитокинов из мононуклеарных фагоцитов и цельной крови (Morath, S. et al.,

J. Exp. Med. 195:1635, 2002; Morath, S. et al., Infect. Immun. 70:938, 2002). Недавно было показано, что L-фиколин специфично связывается с LTA, выделенной из многочисленных видов грамположительных бактерий, включая золотистый стафилококк, и активирует лектиновый путь (Lynch, N.J., et al., J. Immunol. 172:1198-02, 2004). Кроме того, было показано, что MBL связывается с LTA фекального стрептококка, в которой полиглицерофосфатная цепь замещена гликозильными группами, но не с LTA девяти других видов, включающих золотистый стафилококк (Polotsky, V.Y., et al. Infect. Immun. 64:380, 1996).

Таким образом, один аспект настоящего изобретения предлагает способ лечения сепсиса или состояния, возникшего в результате сепсиса, путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующее средства в фармацевтически приемлемом носителе, субъекту, страдающему от сепсиса или состояния, возникшего в результате сепсиса, включая, без ограничения, тяжелую форму сепсиса, септический шок, синдром острой дыхательной недостаточности, возникшей на фоне сепсиса, и синдром системной воспалительной реакции. Предлагаются родственные способы для лечения других заболеваний крови, включая геморрагический шок, гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), гемолитический уремический синдром (HUS) или другие деструктивные заболевания костного мозга/крови, путем введения композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующего средства в фармацевтически приемлемом носителе, субъекту, страдающему от такого состояния. MASP-2 ингибирующее средство вводят субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно (в частности, в случае ARDS), подкожно или другим способом парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае неопиоидных лекарственных средств. Композиция MASP-2 ингибирующего средства может быть объединена с одним или более дополнительными терапевтическими средствами для борьбы с осложнениями сепсиса и/или шока. В случае прогрессирующей стадии сепсиса или шока, или нарушения, возникшего в результате этих заболеваний, ингибирующая MASP-2 композиция может быть соответствующим образом введена в виде лекарственной формы быстрого действия, например, путем внутривенной или внутриаартериальной доставки раствора, содержащего композицию MASP-2 ингибирующего средства. Введение может быть проведено повторно по решению лечащего врача до тех пор, пока болезненное состояние не будет устранено.

Коагулопатии.

Было представлено доказательство роли системы комплемента в диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC), такой как, DIC на фоне серьезного телесного повреждения.

Преыдушие исследования показали, что C4-/- мыши не защищены от реперфузионного повреждения почек (Zhou, W., et al., "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury," J Clin Invest 105:1363-1371 (2000)). С целью изучения способности C4-/- мышей активировать комплемент по классическому или лектиновому пути, измеряли оборот C3 в плазме C4-/- мышей методами анализа, специфичными к направлению активации по классическому или лектиновому пути. Несмотря на то что при инициации активации по классическому пути не наблюдалось расщепление C3, тем не менее, наблюдалась высокоэффективная зависимость от лектинового пути активация C3 в C4-дефицитной сыворотке (фиг. 30). Очевидно, что у MASP-2-/- мышей отложение C3b на маннани и зимозане серьезно нарушено даже при экспериментальных условиях, что, в соответствии с многими ранее опубликованными данными по активации альтернативного пути, должно наблюдаться и для всех трех путей. При использовании одинаковой сыворотки в лунках, покрытых иммуноглобулиновыми комплексами вместо маннана или зимозана, отложение C3b и расщепление фактора В наблюдаются в сыворотке MASP-2+/+ мышей и в сыворотке MASP-2-/- мышей, но не в сыворотке, обедненной по C1q. Это указывает на то, что активация альтернативного пути облегчается в MASP-2-/- сыворотке, когда исходный C3b обеспечивается посредством классической активности. На фиг. 3^С графически проиллюстрированы неожиданно полученные данные о том, что C3 может быть эффективно активирован зависимым от лектинового пути способом в плазме, дефицитной по C4.

Этот "обходной путь активация C4" устраняется ингибированием активации лектинового пути путем предварительной инкубации плазмы с растворимым маннаном или маннозой.

Аберрантная неиммунная активация системы комплемента представляет потенциальную опасность для человека, а также может играть важную роль в активации гематологического пути, особенно в случаях серьезных повреждений, при которых активируются воспалительный и гематологический пути. У здоровых людей, конверсия C3 составляет < 5% от общего C3 белка плазмы. При сильно распространенной инфекции, включающей заражение крови и болезнь иммунных комплексов, конверсия C3 восстанавливается сама по себе примерно до 30% с уровнями комплемента обычно более низкими, чем нормальные, вследствие повышенного использования и изменений в распределении пула. Незамедлительная активация пути C3 больше 30% обычно предоставляет несомненное клиническое доказательство вазодилатации и потери жидкости в тканях. При конверсии C3 свыше 30%, иницирующие механизмы являются преимущественно неиммунными, и обусловленные ими клинические проявления заболеваний представляют опасность для пациента. Уровни комплемента C5 у здоровых людей и при контролируемом заболевании являются более устойчивыми, чем C3. Существенные снижения и или конверсия уровня C5 связаны с реакцией пациента на атипичную политравму (например, дорожно-транспортные происшествия) и

вероятным развитием синдромов шокового легкого. Таким образом, любое доказательство активации комплемента C3 выше 30% васкулярного пула или любое участие C5, или и того и другого, может рассматриваться в качестве вероятного предвестника опасного патологического изменения у пациента.

C3 и C5 высвобождают анафилатоксины (C3a и C5a), которые воздействуют на тучные клетки и базофилы, высвобождая сосудорасширяющие химические вещества. Они устанавливают хематоксические градиенты для направления полиморфно-ядерных клеток (PMN) в центр иммунологических нарушений (лечебная реакция), но здесь они отличаются, так как C5a оказывает специфический эффект комкообразования (агрегации) на эти фагоциты, предотвращая их случайное удаление от места реакции. При нормальной борьбе с инфекцией, C3 активирует C5. Однако при политравме, C5, по-видимому, в значительной степени активируется, системно генерируя анафилатоксины C5a. Эта неконтролируемая активность заставляет полиморфы образовывать комки в сосудистой системе, затем эти комки увлекаются в капилляры легких, которые они закупоривают и вызывают локальные повреждающие воздействия в результате высвобождения супероксида. Не привлекая в качестве доказательства какую-либо теорию, тем не менее, можно предположить, что этот механизм является важным в патогенезе синдрома острой дыхательной недостаточности (ARDS), хотя эта точка зрения недавно ставилась под сомнение. Может быть продемонстрировано, что анафилатоксины C3a *in vitro* являются мощными агрегаторами тромбоцитов, но их участие *in vivo* менее очевидно, и высвобождение тромбоцитарных веществ и плазмينا при заживлении раны может только вторично вовлекать комплемент C3. Возможно, что необходим длительный подъем активации C3 для генерации DIC.

Помимо клеточных и сосудистых эффектов вышеописанного активированного компонента комплемента, которые могут объяснить связь между травмой и DIC, новые научные открытия выявили прямые молекулярные связи и резкую функциональную реакцию между комплементом и коагулирующими системами. Подтверждающие данные были получены при исследованиях C3-дефицитных мышей. Так как C3 является общим компонентом для каждого из путей комплемента, то можно ожидать, что у C3-дефицитных мышей отсутствует полная функция комплемента. Однако, удивительно, но C3-дефицитные мыши способны полностью активировать терминальные компоненты комплемента (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway," Nat. Meet 12:682-687 (2006)). При проведении глубоких исследований было выявлено, что C3-независимая активация терминальных компонентов комплемента опосредована тромбином, ферментом, ограничивающим скорость коагуляционного каскада (Huber et al., 2006). Молекулярные компоненты, опосредующие активацию тромбина после начальной активации комплемента, остались невыясненными.

Авторы настоящего изобретения объяснили, что следует считать молекулярным базисом для резкой реакции между комплементом и коагуляционными каскадами и идентифицировали MASP-2 в качестве центральной контрольной точки, связывающей две системы. Биохимические исследования субстратной специфичности MASP-2 позволили идентифицировать протромбин в качестве возможного субстрата в дополнение к широко известным белкам комплемента C2 и C4. MASP-2 специфически расщепляет протромбин в функционально релевантных местах, генерируя тромбин, фермент, лимитирующий скорость коагуляционного каскада (Krarup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2," PLoS. ONE. 2:e623 (2007)). Тромбин, генерированный MASP-2, способен промотировать отложение фибрина в определенной восстановленной системе *in vitro*, демонстрируя функциональную релевантность MASP-2 расщепления (Krarup et al., 2007). Как это обсуждается в приведенных ниже в этом изобретении примерах, авторы настоящего изобретения дополнительно подтвердили физиологическую значимость данного открытия путем документированного подтверждения активации тромбина в сыворотке здоровых грызунов после активации лектинового пути, и также продемонстрировали, что этот процесс блокируется с помощью моноклональных антител, нейтрализующих MASP-2.

MASP-2 может представлять центральную точку разветвления в лектиновом пути, способную промотировать активацию обеих систем комплемента и коагуляции. Поскольку активация лектинового пути представляет собой физиологическую ответную реакцию на многих виды травматических повреждений, авторы настоящего изобретения полагают, что сопутствующее системное воспаление (опосредованное компонентами комплемента) и диссеминированную коагуляцию (опосредованную через коагуляционный путь) можно объяснить способностью MASP-2 активировать оба пути. Эти выводы четко указывают на роль MASP-2 в возникновении DIC и на положительный терапевтический эффект ингибирования MASP-2 при лечении или предотвращении DIC. MASP-2 может обеспечить молекулярную связь между комплементом и коагулирующей системы, и активация лектинового пути, возникающая при разных травмах, может непосредственно инициировать активацию коагулирующей системы через ось MASP-2-тромбин, обеспечивая механизм связи между травмой и DIC. В соответствии с аспектом настоящего изобретения, ингибирование MASP-2 должно ингибировать активацию лектинового пути и уменьшать генерацию обоих анафилатоксинов C3a и C5a. Полагают, что необходим длительный подъем активации C3 для генерации DIC.

Микроциркуляторная коагуляция (тромбы в капиллярах и мелких кровеносных сосудах) возникает в условиях септического шока.

Роль лектинового пути при септическом шоке установлена и подтверждена на экспериментальных моделях сепсиса на мышах с защищенным фенотипом MASP-2 (-/-), описанных в примере 17 и на фиг. 18 и 19. Более того, как продемонстрировано в примере 15 и на фиг. 16A и 16B, MASP-2 (-/-) мыши защищены в экспериментальной модели локализованной реакции Шварцмана диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC), в модели локализованной коагуляции в микрососудах.

V. MASP-2.

Ингибирующие средства.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способы ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии или подверженного риску развития тромботической микроангиопатии. MASP-2 ингибирующие средства вводят в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента в живых организмах. При осуществлении на практике этого аспекта изобретения, типичные MASP-2 ингибирующие средства включают молекулы, которые ингибируют биологическую активность MASP-2 (такие как низкомолекулярные ингибиторы, антитела против MASP-2 или блокирующие пептиды, которые взаимодействуют с MASP-2 или препятствуют белок-белковому взаимодействию), и молекулы, которые снижают экспрессию MASP-2 (такие как MASP-2 молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, MASP-2 специфические молекулы RNAi и MASP-2 рибозимы), с помощью которых предотвращается MASP-2 активация лектинового пути комплемента. MASP-2 ингибирующие средства могут быть использованы в качестве первичной монотерапии или в комбинации с другими терапевтическими средствами в качестве вспомогательной терапии для усиления положительных терапевтических эффектов других терапевтических способов лечения.

Ингибирование MASP-2 зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения MASP-2 ингибирующего средства в соответствии со способами изобретения: ингибирование генерации или продуцирования продуктов C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (MAC) MASP-2 зависимой активации системы комплемента (измеренное, например, как описано в примере 2), снижение активации комплемента, определяемое в гемолитическом исследовании с использованием несенсибилизированных эритроцитов кроликов или морских свинок (измеренное, например как описано в примере 33), снижение расщепления C4 и отложения C4b (измеренное, например, как описано в примере 2) или снижение расщепления C3 и отложения C3b (измеренное, например, как описано в примере 2).

В соответствии с настоящим изобретением применяются те MASP-2 ингибирующие средства, которые эффективно ингибируют MASP-2 зависимую активацию системы комплемента. MASP-2 ингибирующие средства, применяемые при осуществлении на практике этого аспекта по изобретению, включают антитела против MASP-2 и их фрагменты, ингибирующие MASP-2 пептиды, низкомолекулярные вещества, MASP-2 растворимые рецепторы и ингибиторы экспрессии. MASP-2 ингибирующие средства могут ингибировать MASP-2 зависимую активацию системы комплемента путем блокирования биологической функции MASP-2. Например, ингибирующее средство может эффективно блокировать MASP-2 белок-белковые взаимодействия, препятствовать димеризации или сборке MASP-2, блокировать Ca^{2+} связывание, затрагивать активный сайт MASP-2 серин-протеазы или снижать экспрессию белка MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие средства селективно ингибируют MASP-2 активацию комплемента, не затрагивая C1q зависимой активации системы комплемента.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее средство, применяемое в способах по изобретению, представляет собой специфическое MASP-2 ингибирующее средство, которое специфически связывается с полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 6, с аффинностью, по меньшей мере в десять раз более высокой, чем с другими антигенами в системе комплемента. В другом варианте осуществления, MASP-2 ингибирующее средство специфически связывается с полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 6, с аффинностью связывания, по меньшей мере в 100 раз большей, чем с другими антигенами в системе комплемента. Аффинность связывания MASP-2 ингибирующего средства может быть определена, используя подходящий метод анализа связывания.

MASP-2 полипептид характеризуется молекулярной структурой, аналогичной структуре MASP 1, MASP 3, и C1r и C1s протеаз C1 системы комплемента. Молекула кДНК, описанная в последовательности SEQ ID NO: 4, кодирует типичный пример MASP-2 (состоящей из аминокислотной последовательности, описанной в последовательности SEQ ID NO: 5) и продуцирует человеческий MASP-2 полипептид с лидерной последовательностью (aa 1-15), который расщепляется после секреции, давая в результате зрелую форму человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 6). Как показано на фиг. 2, ген человеческой MASP-2 охватывает двенадцать экзонов. MASP-2 кДНК человека кодируется экзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K и L. Альтернативное сплайсирование дает в результате белок с молекулярной массой 20 кДа, называемый MBL-ассоциированным белком 19 ("MAP19", также называемым "sMAP") (SEQ ID NO: 2), кодируемый последовательностью SEQ ID NO: 1, возникающей из экзонов B, C, D и E, как показано на фиг. 2. Молекула кДНК, описанная в последовательности SEQ ID NO: 50, кодирует мышиную MASP-2 (состоящую из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 51) и дает мышинный MASP-2 полипептид с лидерной последовательностью, который расщепляется после секреции, приводя в результате к

зрелой форме мышинной MASP-2 (SEQ ID NO: 52). Молекула кДНК, описанная в последовательности SEQ ID NO: 53, кодирует крысиную MASP-2, состоящую из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 54), и дает крысиный MASP-2 полипептид с лидерной последовательностью, который расщепляется после секреции, приводя в результате к зрелой форме крысинной MASP-2 (SEQ ID NO: 55).

Для специалистов в этой области является очевидным, что последовательности, описанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, представляют единичные аллели человеческой, мышинной и крысинной MASP-2, соответственно, и что предполагается возникновение аллельной вариации и альтернативного сплайсирования. Аллельные вариации нуклеотидных последовательностей, описанных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, в том числе те, которые содержат молчащие мутации, и те, в которых мутации приводят к изменениям аминокислотной последовательности, входят в объем настоящего изобретения. Аллельные вариации MASP-2 последовательности могут быть клонированы с помощью зондирующей кДНК или банков генов от различных индивидуумов в соответствии со стандартными методиками.

Домены белка человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 6) показаны на фиг. 1 и 2А и включают N терминальный домен C1r/C1s/фактора роста эндотелия сосудов (Vegf) морского ежа/морфогенного белка костей (CUBI) (aa 1-121 последовательности SEQ ID NO: 6), домен, подобный эпидермальному фактору роста (aa 122-166), второй домен CUBI (aa 167-293), а также tandemные домены белков, контролирующей активность комплемента, и домен серин-протеазы. Альтернативное сплайсирование гена MASP-2 дает в результате MAP19, показанного на фиг. 1. MAP19 представляет собой неферментный белок, содержащий N терминальную CUBI EGF область MASP-2 с четырьмя дополнительными остатками (EQSL), полученными из эксона E, показанного на фиг. 1.

Было показано, что различные белки связываются или взаимодействуют с MASP-2 в результате белок-белковых взаимодействий. Например, известно, что MASP-2 связывается и образует Ca^{2+} зависимые комплексы с лектиновыми белками MBL, Н фиколина и L фиколина. Было показано, что каждый комплекс MASP-2/лектин активирует комплемент через MASP-2 зависимое расщепление белков C4 и C2 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-1504, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Исследования показали, что CUB1-EGF домены MASP-2 имеют большое значение при ассоциации MASP-2 с MBL (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Было также показано, что домены CUB1EGFCUB2 опосредуют димеризацию MASP-2, которая требуется для образования активного комплекса MBL (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Поэтому, могут быть идентифицированы MASP-2 ингибирующие средства, которые связываются или взаимодействуют с MASP-2 таргетными областями, по поводу которых известно, что они являются важными для MASP-2 зависимой активации комплемента.

Антитела против MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, которое ингибирует MASP-2 зависимую активацию системы комплемента. Антитела против MASP-2, применяемые в этом аспекте изобретения, включают поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела, полученные из любого антитела, продуцируемого млекопитающим, и они могут представлять собой полиспецифические, химерные, гуманизированные, антиидиотипические антитела и фрагменты антител. Фрагменты антител включают Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv фрагменты, scFv фрагменты и одноцепочечные антитела, описанные в изобретении далее.

В литературе описаны различные антитела против MASP-2, некоторые из которых приведены ниже в табл. 1. Эти ранее описанные антитела против MASP-2 могут быть подвергнуты скринингу на их способность ингибировать MASP-2 зависимую активацию системы комплемента, используя описанные в изобретении методы исследований. Например, были идентифицированы Fab2 крысинные антитела против MASP-2, которые блокируют MASP-2 зависимую активацию комплемента, как это более подробно описано в изобретении в примерах 10 и 11. После того, как идентифицировано антитело против MASP-2, которое действует как MASP-2 ингибирующее средство, оно может быть использовано для продуцирования антиидиотипических антител и использовано для идентификации других MASP-2 связывающих молекул, описанных ниже.

Таблица 1
MASP-2 специфические антитела, описанные в научной литературе

АНТИГЕН	ТИП АНТИТЕЛА	ССЫЛКА
Рекомбинантный MASP-2	Крысиное поликлональное	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803 811, 2000
Рекомбинантный человеческий CCP1/2 SP фрагмент (MoAb 8B5)	Крысиное MoAb (субкласс IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159 167, 2003
Рекомбинантный человеческий MAP19 (MoAb 6G12) (перекрестные реакции с MASP-2)	Крысиное MoAb (субкласс IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159 167, 2003
hMASP-2	Мышиное MoAb (S/P) Мышиное MoAb (N-терминальное)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP домен)	Крысиное MoAb: Nimoab 101, продуцированное клетками линии гибридомы 03050904 (ЕСАСС)	WO 2004/106384
hMASP-2 (полноразмерный-меченый гистидином)	Мышиные MoAbs: NimoAb 104, продуцированное клетками линии гибридомы M0545YM035 (DSMZ) NimoAb 108, продуцированное клетками линии гибридомы M0545YM029 (DSMZ) NimoAb 109, продуцированное клетками линии гибридомы M0545YM046 (DSMZ) NimoAb 110, продуцированное клетками линии гибридомы M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384

Антитела против MASP-2 с пониженной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, антитела против MASP-2 имеют пониженную эффекторную функцию, для того чтобы уменьшать воспаление, которое может возникать в результате активации классического пути комплемента. Было показано, что способность молекул IgG инициировать классический путь комплемента присуща внутренней Fc части молекулы (Duncan, A.R., et al., Nature 332:738 740 1988). Молекулы IgG, в которых Fc часть молекулы была удалена путем ферментативного расщепления, лишена этой эффекторной функции (см. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Соответственно, антитела с пониженной эффекторной функцией могут быть образованы в результате недостаточности Fc части молекулы за счет наличия генетически сконструированной Fc последовательности, которая минимизирует эффекторную функцию или является изотипом человеческого IgG2 или IgG4.

Антитела с пониженной эффекторной функцией могут быть продуцированы путем стандартной молекулярной биологической манипуляции с Fc частью тяжелых цепей IgG, как описано в изобретении в примере 9, а также описано в публикации Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol. 10:241 250, 1993, and Rodrigues et al., J. Immunol. 151:6954 6961, 1998. Антитела с пониженной эффекторной функцией также включают изотипы человеческих IgG2 и IgG4, которые имеют пониженную способность активировать комплемент и/или взаимодействовать с Fc-рецепторами (Ravetch, J.V., et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457 492, 1991; Isaacs, J.D., et al., J. Immunol. 148:3062 3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., Immunol. Today 14:215 221, 1993). Гуманизированные или полностью человеческие антитела, специфические к человеческой MASP-2, состоящие из IgG2 или IgG4 изотипов, могут быть продуцированы одним из нескольких методов, известных любому обычному специалисту в этой области, которые описаны в публикации Vaughan, T.J., et al., Nature Biotechnical 16:535 539, 1998.

Продукция антител против MASP-2.

Антитела против MASP-2 могут быть продуцированы путем использования MASP-2 полипептидов (например, полноразмерной MASP-2) или путем использования антигенных пептидов, несущих MASP-2 эпитоп (например, часть MASP-2 полипептида). Иммуногенные пептиды могут иметь размеры в пределах пяти аминокислотных остатков. Например, MASP-2 полипептид, включающий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, может быть использован для индуцирования антитела против

MASP-2, применяемого в способе по изобретению. Конкретные MASP-2 домены, по поводу которых известно, что они вовлечены в белок-белковые взаимодействия, такие как CUBI и CUBIEGF домены, так же как область, охватывающая активный сайт серин-протеазы, могут быть экспрессированы в форме рекомбинантных полипептидов, как описано в примере 3, и использоваться в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, включающие часть по меньшей мере 6 аминокислот MASP-2 полипептида (SEQ ID NO: 6) также используют для индуцирования MASP-2 антител. Дополнительные примеры полученных из MASP-2 антигенов, используемых для индуцирования MASP-2 антител, приводятся ниже в табл. 2. MASP-2 пептиды и полипептиды, используемые для индуцирования антител, могут быть выделены в форме натуральных полипептидов или рекомбинантных или синтетических пептидов и каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов, таких как MASP-2A, описанных далее в примерах 5-7. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, антитела против MASP-2 получают, используя штамм трансгенных мышей, как описано в примерах 8 и 9 и дополнительно описано ниже.

Антигены, используемые для продуцирования антител против MASP-2, также включают рекомбинантные полипептиды, такие как рекомбинанты MASP-2 или ее части с полипептидом иммуноглобулина или с белком, связывающим мальтозу. Полипептидный иммуноген может представлять собой полноразмерную молекулу или ее часть. Если полипептидная часть подобна гаптену, то такая часть может быть успешно объединена или связана с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH), альбумин бычьей сыворотки (BSA) или столбнячный токсин) для иммунизации.

Таблица 2
Антигены, полученные из MASP-2

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:6	Белок человеческой MASP-2
SEQ ID NO:51	Белок мышиной MASP-2
SEQ ID NO:8	CUBI домен человеческой MASP-2 (aa 1-121 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	CUBIEGF домены человеческой MASP-2 (aa 1-166 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	CUBIEGFCUBII домены человеческой MASP-2 (aa 1-293 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	EGF домены человеческой MASP-2 (aa 122-166 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:12	Домен серин-протеазы человеческой MASP-2 (aa 429-671 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:13	GKDSRCRGDAGGALVFL серин-протеаза инактивированная мутантная форма (aa 610-625 последовательности SEQ ID NO:6 с мутированным Ser 618)
SEQ ID NO:14	TPLGPKWPEPVFGRL человеческий CUBI пептид
SEQ ID NO:15:	TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSS GAKVLATLCGQ человеческий CUBI пептид
SEQ ID NO:16	TFRSDYSN MBL область связывания в человеческом CUBI домене
SEQ ID NO:17	FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFRTGF MBL область связывания в человеческом CUBI домене
SEQ ID NO:18	IDECQVAPG EGF пептид
SEQ ID NO:19	ANMLCAGLES GKGDSRCRGDSSGALV пептид из активного сайта серин-протеазы

Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела против MASP-2 могут быть получены путем иммунизации животного с помощью MASP-2 полипептида или его иммуногенной части, используя методы, которые хорошо известны обычным специалистам в этой области. Смотрите, например, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), page 105, и методы, описанные далее в примере 6. Иммуногенность MASP-2 полипептида может быть повышена путем использования адъюванта, включающего минеральные гели, такие как гидроксид алюминия или адъювант Фрейнда (полный или неполный), поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиэтиленполипропиленоксидные полиолы, полианионы, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол. Поликлональные антитела обычно продуцируются в животных, таких как лошади, коровы, собаки, цыплята, крысы, мыши,

кролики, морские свинки, козы или овцы. В качестве варианта, антитело против MASP-2, применяемое в настоящем изобретении, может также быть получено от человекообразных обезьян. Общие методы продуцирования диагностических и терапевтических антител у бабуинов можно найти, например, в патентном документе Goldenberg et al., International Patent Publication No. WO 91/11465 и в публикации Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Сыворотки, содержащие иммунологически активные антитела, затем продуцируют из крови таких иммунизированных животных, используя хорошо известные стандартные методы.

Моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело против MASP-2. Моноклональные антитела против MASP-2 являются высокоспецифичными, направленными против единственного MASP-2 эпитопа. Используемое в изобретении определение "моноклональное" указывает на то, что характерной особенностью антитела является его получение из практически гомогенной популяции антител, но это определение не подразумевает необходимости продуцирования антитела каким-либо конкретным методом. Моноклональные антитела могут быть получены любым методом, который обеспечивает продуцирование молекул антитела стабильными клеточными линиями при культивировании, таким как гибридомный метод, описанный в публикации Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975, или они могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см. например, патентный документ U.S. Patent No. 4816567 to Cabilly). Моноклональные антитела могут быть также выделены из библиотек фаговых антител, используя методы, описанные в публикации Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991, и в публикации Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Такие антитела могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и любой их субкласс.

Например, моноклональные антитела могут быть получены путем инъекции подходящему млекопитающему (например, мышам BALB/c) композиции, включающей MASP-2 полипептид или его часть. После заданного периода времени, у мышей удаляют спленоциты и суспендируют их в среде клеточной культуры. Спленоциты затем гибридизируют с иммортализованной линией клеток с образованием гибридомы. Образованные гибридомы выращивают в клеточной культуре и подвергают скринингу на их способность продуцировать моноклональное антитело против MASP-2. Пример, в котором подробно описано продуцирование моноклональных антител против MASP-2, приводится в примере 7. См. также *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, pages 2.5.1-2.6.7, 1991.).

Человеческие моноклональные антитела могут быть получены путем использования трансгенных мышей, которые были созданы для продуцирования специфических человеческих антител в ответ на антигенный стимул. В этом методе, элементы локуса тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина вводят в штаммы мышей, полученные из линий эмбриональных стволовых клеток, которые содержат таргетные поврежденные локусы тяжелой и легкой цепи эндогенного иммуноглобулина. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела, специфические к человеческим антигенам, таким как описанные в изобретении антигены MASP-2, и мыши могут быть использованы для продуцирования человеческого MASP-2 антитела, путем выделения гибридом в результате гибридизации В-клеток от таких животных с подходящими линиями миеломных клеток, используя традиционную гибридомную технологию Колера-Мильштейна, описанную далее в примере 7. Трансгенные мыши с геном человеческого иммуноглобулина могут быть приобретены у фирм-производителей (например, у фирмы Abgenix, Inc., Fremont, CA, и фирмы Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Методы получения человеческих антител от трансгенных мышей описаны, например, в публикациях Green, L.L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature* 368:856, 1994; и Taylor, L.D., et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Моноклональные антитела могут быть выделены из гибридных культур и очищены с помощью ряда хорошо известных методов. Такие методы выделения включают аффинную хроматографию с белком А на сефарозе, гильпронирующую хроматографию и ионообменную хроматографию (см. например, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, pages 79-104, 1992).

После продуцирования, поликлональные, моноклональные или полученные из фагов антитела сначала подвергают исследованию на специфичность связывания с MASP-2. Может быть использован ряд исследований, которые хорошо известны специалистам в этой области, для выявления антител, которые специфично связываются с MASP-2. Примеры исследований включают вестерн-блоттинг или анализ иммунопреципитации стандартными методами (например, описанными в публикации Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, иммуносорбентные анализы с ферментной меткой, дот-блоттинг, исследования ингибирования или конкуренции и сэндвич-анализы (описанные в Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После идентификации антител, которые специфически связываются с MASP-2, антитела против MASP-2 подвергают испытанию на способность действовать в качестве MASP-2 ингибирующего средства в одном из нескольких исследований, таких как, например, исследование лектин специфического расщепления C4 (описанное в примере 2), исследование отложения C3b (описанное в примере 2) или исследование отложения C4b (описанное в примере 2).

Аффинность моноклональных антител против MASP-2 может быть легко определена обычным спе-

циалистом в этой области (см. например, Scatchard, A., NY Acad. Sci. 51:660 672, 1949). В одном варианте осуществления моноклональные антитела против MASP-2, применяемые в способах по изобретению, связываются с MASP-2 с величиной аффинности связывания <100 нМ, предпочтительно, <10 нМ, и наиболее предпочтительно, <2 нМ. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело, применяемое в способах по изобретению, представляет собой ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67) и вариабельную область легкой цепи по меньшей мере с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

Химерные/гуманизированные антитела.

Моноклональные антитела, применяемые в способе по изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи тождественна или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или субклассу антител, а остальная часть цепи (цепей) тождественна или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу или субклассу антител, а также фрагменты таких антител (U.S. Patent No. 4816567, to Cabilly; и Morrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851 6855, 1984).

Одной из форм химерного антитела, применяемой в изобретении, является гуманизированное моноклональное антитело против MASP-2. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела продуцируют путем переноса нечеловеческих (например, мышиных) определяющих комплементарность участков (CDR) из тяжелых и легких вариабельных цепей мышиного иммуноглобулина в человеческий вариабельный домен. Обычно, остатки человеческого антитела затем заменяют в каркасных областях нечеловеческих аналогов. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации получают для последующего проведения очистки антител. Обычно, гуманизированное антитело может включать практически весь, по меньшей мере один, и, обычно, два вариабельных домена, в которых все или практически все гипервариабельные петлевые фрагменты соответствуют гипервариабельным петлевым фрагментам нечеловеческого иммуноглобулина, и все или практически все Fv каркасные области являются Fv каркасными областями последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно может также включать, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, которая обычно является частью человеческого иммуноглобулина. Более подробную информацию можно найти в публикациях Jones, P.T., et al., Nature 321:522 525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323 329, 1988; и Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593 596, 1992.

Гуманизированные антитела, применяемые в изобретении, включают человеческие моноклональные антитела, содержащие, по меньшей мере, MASP-2 связывающий CDR3 участок. Кроме того, части Fc могут быть заменены так, чтобы продуцировать IgA или IgM, а также человеческие IgG антитела. Такие гуманизированные антитела могут иметь особое клиническое применение, так как они могут специфически распознавать человеческую MASP-2, но не провоцировать иммунный ответ у людей против антитела самого по себе. Следовательно, они лучше подходят для *in vivo* введения людям, особенно, когда необходимо повторное или продолжительное введение.

Пример генерирования гуманизированного антитела против MASP-2 из мышиного моноклонального антитела против MASP-2 приводится в примере 6. Методы продуцирования гуманизированных моноклональных антител также описаны, например, в публикациях Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399-434, 1996; и в патентном документе U.S. Patent No.

5693762, to Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые могут синтезировать гуманизированные антитела из специфических участков мышиных антител, такие как Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела.

Антитела против MASP-2 могут быть также получены путем использования рекомбинантных методов. Например, человеческие антитела могут быть получены путем использования библиотеки экспрессируемых последовательностей человеческого иммуноглобулина (поставляемой, например, фирмой Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для продуцирования фрагментов человеческих антител (VH, VL, Fv, Fd, Fab или F(ab')₂). Эти фрагменты затем используют для конструирования человеческого антитела в целом, используя методы, аналогичные методам продуцирования химерных антител.

Антиидиотипические антитела.

После идентификации антител против MASP-2 с требуемой ингибирующей активностью, эти антитела могут быть использованы для генерации антиидиотипических антител, которые имеют сходство с частью MASP-2, используя хорошо известные методы. Смотрите, например, публикацию Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993. Например, антитела, которые связываются с MASP-2 и конкурирующе ингибируют взаимодействие белка MASP-2, которое необходимо для активации комплемента, могут быть использованы для генерации антиидиотипов, имеют сходство с MBL связывающим сайтом на белке MASP-2 и, поэтому, связывают и нейтрализуют связывающий лиганд MASP-2, такой как, например, MBL.

Фрагменты иммуноглобулина.

MASP-2 ингибирующие средства, применяемые в способе изобретения, охватывают не только интактные молекулы иммуноглобулина, но также хорошо известные фрагменты, включающие Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и Fv фрагменты, scFv фрагменты, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Хорошо известно, что только небольшая часть молекулы антитела, антигенсвязывающий центр, вовлечен в связывание антитела с его эпитопом (см. например, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Участки антитела pFc' и Fc являются эффекторами классического пути комплемента, но они не вовлечены в связывание антигена. Антитело, в котором был ферментативно расщеплен участок pFc', или антитело, которое было продуцировано без участка pFc', обозначают как F(ab')₂ фрагмент, и оно сохраняет оба участка связывания антигена интактного антитела. Выделенный F(ab')₂ фрагмент называют двухвалентным моноклональным фрагментом, вследствие его двух участков связывания антигена. Аналогично, антитело, в котором был ферментативно расщеплен участок Fc, или антитело, которое было продуцировано без участка Fc, обозначают как Fab фрагмент, и оно сохраняет один из участков связывания антигена молекулы интактного антитела.

Фрагменты антител могут быть получены традиционными методами протеолитического гидролиза, такими как гидролиз полных антител при воздействии пепсина или папаина. Например, фрагменты антитела могут быть продуцированы ферментативным расщеплением антител пепсином с получением 5S фрагмента, обозначаемого как F(ab')₂. Этот фрагмент может быть расщеплен далее с использованием реагента, восстанавливающего тиол, с продуцированием 3. 5S Fab' моновалентных фрагментов.

Необязательно, реакция расщепления может быть проведена с использованием группы, блокирующей сульфгидрильные группы, которые возникают вследствие расщепления дисульфидных связей. В качестве варианта, ферментативное расщепление с использованием пепсина непосредственно продуцирует два моновалентных Fab фрагмента и Fc фрагмент непосредственно. Эти методы описаны, например, в патентном документе U.S. Patent No. 4331647 to Goldenberg; в публикациях Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., in Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; and by Coligan at pages 2.8.1 2.8.10 and 2.10. 2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления предпочтительным является использование фрагментов антител, не имеющих участок Fc, для того чтобы предотвратить активацию классического пути комплемента, который инициируется после связывания Fc с Fcγ рецептором. Известны несколько методов продуцирования MoAb, которые предотвращают взаимодействия Fcγ рецептора. Например, Fc участок моноклонального антитела может быть удален химическим путем, используя неполное ферментативное расщепление под действием протеолитических ферментов (такое как ферментативное расщепление под действием фицина), генерируя вследствие этого, например, антигенсвязывающие фрагменты антитела, такие как Fab или F(ab)₂ фрагменты (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69 71, 1991). В качестве варианта, человеческий γ4 IgG изотип, который не связывает Fcγ рецепторы, может быть использован при конструировании описанного в изобретении гуманизированного антитела. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, которые не имеют Fc домен, могут также быть сконструированы, используя описанные в изобретении рекомбинантные методы.

Одноцепочечные фрагменты антител.

В качестве варианта, можно создать одноцепочечный пептид, связывающий молекулы, специфичные в отношении MASP-2, в котором соединены Fv участки тяжелой и легкой цепи. Fv фрагменты могут

быть соединены с помощью пептидного линкера с образованием одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Эти одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают путем конструирования структурного гена, включающего последовательности ДНК, кодирующие VH и VL домены, которые соединены с помощью олигонуклеотида. Структурный ген вставляют в экспрессирующий вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как кишечная палочка. Рекомбинантные клетки-хозяина синтезируют одноцепочечный полипептид с пептидным линкером, соединяющим мостиком два V домена. Методы продуцирования scFvs описаны, например, в публикациях Whitlow, et al., "Методы. A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; в патентном документе U.S. Patent No. 4946778, to Ladner; в публикации Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993.

В качестве иллюстративного примера, MASP-2 специфический scFv может быть получен путем воздействия на лимфоциты полипептидом MASP-2 *in vitro* и выбора дисплея библиотеки антител в фаге или в аналогичных векторах (например, путем использования иммобилизованного или меченого белка или пептида MASP-2). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные домены связывания полипептида MASP-2, могут быть получены путем скрининга рандомизированных библиотек пептидов на дисплеи фага или на дисплеи бактерии, такой как кишечная палочка. Эти рандомизированные дисплейные библиотеки пептидов могут быть использованы для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с MASP-2. Методы создания и скрининга таких рандомизированных дисплейных библиотек пептидов хорошо известны (патентные документы U.S. Patent No. 5223409, to Lardner; U.S. Patent No. 4946778, to Ladner; U.S. Patent No. 5403484, to Lardner; U.S. Patent No. 5571698, to Lardner; и публикация Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins, Academic Press, Inc., 1996), и рандомизированные дисплейные библиотеки пептидов и наборы для скрининга таких библиотек могут быть приобретены у соответствующих фирм, например, у фирм CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Другой формой фрагмента антитела против MASP-2, применяемой в этом аспекте изобретения, является пептид, кодирующий единственный гипервариабельный участок (CDR), который связывается с эпитопом на антигене MASP-2 и ингибирует MASP-2 зависимую активацию комплемента. CDR пептиды ("минимальные распознающие компоненты") могут быть получены путем конструирования генов, кодирующих CDR соответствующего антитела. Такие гены получают, например, путем использования полимеразной цепной реакции для синтеза вариабельной области из РНК антитела, продуцирующего клетки (см. например, Larrick et al., Методы. A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley Liss, Inc., 1995).

Описанные в изобретении MASP-2 антитела вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство представляет собой высоко аффинное человеческое или гуманизированное моноклональное антитело против MASP-2 с пониженной эффекторной функцией.

Пептидные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает выделенные пептидные ингибиторы MASP-2, в том числе выделенные природные пептидные ингибиторы и синтетические пептидные ингибиторы, которые ингибируют MASP-2 зависимую активацию системы комплемента. Используемый в изобретении термин "выделенные пептидные ингибиторы MASP-2" относится к пептидам, ингибирующим MASP-2 зависимую активацию комплемента, путем связывания с MASP-2, путем конкуренции с MASP-2 за связывание с другой молекулой распознавания (например, MBL, Н-фиколином, М-фиколином или L-фиколином), по лектиновому пути, и/или путем непосредственного взаимодействия с MASP-2 для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента, которые являются практически чистыми и фактически не содержат других веществ, с которыми они могут обнаруживаться в природе, в степени, которая обеспечивает на практике их предполагаемое применение и соответствует их предполагаемому применению.

Пептидные ингибиторы успешно использовались *in vivo* для предотвращения белок-белковых взаимодействий и отрицательного воздействия на каталитические сайты. Например, пептиды, ингибирующие адгезивные молекулы, структурно родственные с LFA 1, недавно были разрешены к применению в клинической практике при лечении коагулопатий (Ohman, E.M., et al., European Heart J. 16:50 55, 1995). Было описано, что короткие линейные пептиды (< 30 аминокислот) предотвращают или отрицательно воздействуют на интегрин зависимую адгезию (Murayama, O., et al., J. Biochem. 120:445 51, 1996). Более длинные пептиды, с длиной в диапазоне от 25 до 200 аминокислотных остатков, были успешно использованы для блокирования интегрин зависимой адгезии (Zhang, L., et al., J. Biol. Chem. 271 (47):29953 57, 1996). Обычно, более длинные пептидные ингибиторы обладают более высокими величинами аффинности и/или более низкими скоростями диссоциации, чем короткие пептиды, и, поэтому, они могут быть более активными ингибиторами. Было также показано, что циклические пептидные ингибиторы являются эффективными ингибиторами интегринов *in vivo* при лечении воспалительных заболеваний у человека

(Jackson, D.Y., et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). Один метод продуцирования циклических пептидов осуществляется путем синтеза пептидов, у которых терминальные аминокислоты пептида являются цистеинами, которые позволяют пептиду существовать в циклической форме в результате образования дисульфидной связи между терминальными аминокислотами, что, как было показано, повышает аффинность и период полувыведения *in vivo* при лечении гематопозитических неоплазий (см. например, патентный документ U.S. Patent No. 6649592, to Larson).

Синтетические пептидные ингибиторы MASP-2.

MASP-2 ингибирующие пептиды, применяемые в способах этого аспекта изобретения, характеризуются аминокислотными последовательностями, которые имитируют таргетные участки, важные для функционирования MASP-2. Ингибирующие пептиды, применяемые при осуществлении на практике способов по изобретению, имеют размер в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 300 аминокислот. В табл. 3 приведен список типичных ингибирующих пептидов, которые могут применяться при осуществлении на практике этого аспекта настоящего изобретения. Представляющий интерес MASP-2 ингибирующий пептид может быть подвергнут испытанию на его способность действовать в качестве MASP-2 ингибирующего средства в одном из нескольких исследований, включающих, например, исследование специфического расщепления C4 лектином (описанное в примере 2), и исследование отложения C3b (описанное в примере 2).

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие пептиды получают из MASP-2 полипептидов, и выбирают их из полноразмерного зрелого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) или из конкретного домена белка MASP-2, такого как, например, домен CUBI (SEQ ID NO: 8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), домен EGF (SEQ ID NO: 11) и домен серин-протеазы (SEQ ID NO: 12). Как описано выше, было показано, что участки CUBEGFCUBII необходимы для димеризации и связывания с MBL (Thielens et al., *supra*). В частности, в исследовании, в котором идентифицировали наличия у человека гомозиготной мутации Asp105 в Gly105, было показано, что пептидная последовательность TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) в домене CUBI MASP-2 вовлечена в связывание с MBL, что приводит к потере MASP-2 в MBL комплексе (Stengaard Pedersen, K., et al., New England J. Med. 349:554-560, 2003).

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие пептиды получают из белков лектина, которые связываются с MASP-2 и вовлечены в лектиновый путь комплемента. Было идентифицировано несколько различных лектинов, которые вовлечены в этот путь, включая маннан-связывающий лектин (MBL), L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Эти лектины присутствуют в сыворотке крови в виде олигомеров гомотримерных субъединиц, каждая из которых обладает N-терминальными коллагеноподобными волокнами с доменами распознавания углеводов. Было показано, что эти различные лектины связываются с MASP-2, и комплекс лектин/MASP-2 активирует комплемент через расщепление белков C4 и C2. Н-фиколин имеет аминотерминальный участок из 24 аминокислот, коллагеноподобный домен с 11 Gly-Хаа-Уаа повторами, шеечный домен из 12 аминокислот, и фибриногеноподобный домен из 207 аминокислот (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Н-фиколин связывается с GlcNAc и агглютинирует эритроциты человека, покрытые LPS, полученным из подвидов сальмонелл *S. typhimurium*, *S. Minnesota*, и кишечной палочки *E. coli*. Было показано, что Н-фиколин связан с MASP-2 и MAp19 и активирует лектиновый путь (в той же публикации). L-фиколин/P35 также связывается с GlcNAc, и, как было показано, ассоциируется с MASP-2 и MAp19 в сыворотке человека, и этот комплекс, как было продемонстрировано, активирует лектиновый путь (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). Соответственно, MASP-2 ингибирующие пептиды, применяемые в настоящем изобретении, могут включать участок по меньшей мере из 5 аминокислот, выбранных из белка MBL (SEQ ID NO: 21), белка Н-фиколина (номер доступа в базе данных Genbank NM 173452), М-фиколина (номер доступа в базе данных Genbank O00602) и белка L-фиколина (номер доступа в базе данных Genbank NM_015838).

Более конкретно, учеными был идентифицирован сайт связывания MASP-2 на MBL, находящийся внутри 12 Gly-X-Y триплетов "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO: 26), которые лежат между шарниром и шейкой в С-терминальной части коллагеноподобного домена МБЛ (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). Этот участок сайта связывания MASP-2 является также высоко консервативным в человеческом Н-фиколине и человеческом L-фиколине. Был описан консенсусный сайт связывания, который присутствует во всех трех лектиновых белках, включающий аминокислотную последовательность "OGK-X-GP" (SEQ ID NO: 22), где буква "O" обозначает гидроксипролин, а буква "X" обозначает гидрофобный остаток (Wallis et al., 2004, приведенная выше публикация). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, MASP-2 ингибирующие пептиды, применяемые в этом аспекте изобретения, имеют, по меньшей мере, длину из 6 аминокислот и включают последовательность SEQ ID NO: 22. Было показано, что пептиды, полученные из MBL, которые включают аминокислотную последовательность "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO: 24), связывают MASP-2 *in vitro* (Wallis, et al., 2004, приведенная выше публикация). Для усиления связывания с MASP-2, могут быть синтезированы пептиды, которые фланкированы двумя GPO триплетами на каждом конце ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO: 25), с целью усиления обра-

зования тройных спиралей, обнаруживаемых в нативном белке MBL (как это более подробно описано в публикации Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

MASP-2 ингибирующие пептиды могут быть также получены из человеческого Н-фиколина, которые включает последовательность "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO: 27) из консенсусного участка связывания MASP-2 в Н-фиколине. Кроме того, к ним относятся пептиды, полученные из человеческого L-фиколина, которые включает последовательность "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO: 28) из консенсусного участка связывания MASP-2 в L-фиколине.

MASP-2 ингибирующие пептиды могут быть также получены из сайта расщепления C4, такого как "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO: 29), который является сайтом расщепления C4, связанным с C-терминальной частью антитромбина III (Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

Таблица 3

Примеры пептидов, ингибирующих MASP-2

SEQ ID NO	Источник
SEQ ID NO:6	Белок человеческой MASP-2
SEQ ID NO:8	CUBI домен MASP-2 (aa 1-121 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	CUBIEGF домены MASP-2 (aa 1-166 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	CUBIEGFCUBII домены MASP-2 (aa 1-293 последовательности SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	EGF домен MASP-2 (aa 122-166)
SEQ ID NO:12	Домен серин-протеазы MASP-2 (aa 429-671)
SEQ ID NO:16	MBL участок связывания в MASP-2
SEQ ID NO:3	Человеческий MAP19
SEQ ID NO:21	Белок человеческого MBL
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, где "O"=гидроксипролин, и "X" обозначает гидрофобный аминокислотный остаток	Консенсусный сайт связывания синтетического пептида из человеческого MBL и человеческих фиколинов
SEQ ID NO:23 OGKLG	Основной связывающий сайт человеческого MBL
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Триплеты 6-10 человеческого MBP, демонстрирующие связывание с MASP-2
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPPOGPOGPO	Триплеты с GPO человеческого MBP, добавленные для усиления образования тройных спиралей
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPOGKLGP POGNOGPSGSGPKGQKGDGKS	Триплеты 1-17 человеческого MBP
SEQ ID NO:27 GAOGSOGKGAOGFQGPPOGPOGKMGPKGEO GDO	Человеческий Н-фиколин (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPO GKAGPOGPNGAOGEO	Человеческий L-фиколин P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Сайт расщепления человеческого C4

Примечание: буква "O" обозначает гидроксипролин, буква "X" обозначает гидрофобный остаток. Пептиды, полученные из сайта расщепления C4, а также другие пептиды, которые ингибируют сайт серин-протеазы MASP-2, могут быть химически модифицированы, для того чтобы они стали необратимо действующими ингибиторами протеазы. Например, соответствующие модификации могут включать, но этим не ограничивая, галогенметилкетоны (Br, Cl, I, F) на C-конце, Asp или Glu, или присоединенные к функциональным боковым цепям; галогенацетильные (или другие α-галогенацетильные) группы на аминогруппах или других функциональных боковых цепях; эпоксидные или иминсодержащие группы на аминном или на карбоксильном конце, или на функциональных боковых цепях; или имидатные эфиры на аминном или на карбоксильном конце, или на функциональных боковых цепях. Такие модификации могут давать преимущества, заключающиеся в постоянном ингибировании фермента за счет ковалентного присоединения пептида. Это дает возможность уменьшать эффективные дозы и/или снижать частоту введение пептидного ингибитора.

Помимо описанных выше ингибирующих пептидов, MASP-2 ингибирующие пептиды, применяемые в способе по изобретению, включают пептиды, содержащие MASP-2 связывающий CDR3 участок анти MASP-2 MoAb, получаемые, как описано в изобретении. Последовательность CDR участков для использования в синтезе пептидов может быть определена с помощью хорошо известных методов. Ва-

риабельная область тяжелой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно находится в диапазоне от 100 до 150 аминокислот. Вариабельная область легкой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно находится в диапазоне от 80 до 130 аминокислот. Последовательности CDR в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей включают приблизительно только 3-25 аминокислотных последовательностей, которые могут быть легко секвенированы любым специалистом в этой области.

Для специалистов в этой области является очевидным, что практически гомологичные вариации описанных выше MASP-2 ингибирующих пептидов также должны проявлять MASP-2 ингибирующую активность. Примеры вариаций включают, но этим не ограничивая, пептиды, имеющие вставки, делеции, замены и/или дополнительные аминокислоты на карбоксильных или аминных концевых частях указанных пептидов или их смесей. Соответственно, считается, что гомологичные пептиды, которые обладают MASP-2 ингибирующей активностью, могут применяться в способах по этому изобретению. Описанные пептиды могут также включать дублированные мотивы и прочие модификации с консервативными заменами. Консервативные варианты описаны в других местах изобретения, и они включают обмен аминокислоты на другую аминокислоту с подобным зарядом, размером или гидрофобностью и другими подобными свойствами.

MA SP-2 ингибирующие пептиды могут быть модифицированы с целью увеличения растворимости и/или максимизации положительного или отрицательного заряда, для того чтобы они как можно более точно напоминали сегмент в интактном белке. Производное может иметь, или может не иметь точной структуры первичной аминокислоты раскрытого в изобретении пептида при условии, что производное функционально сохраняет необходимое свойство ингибировать MASP-2. Модификации могут включать замену аминокислоты на одну из двадцати общеизвестных аминокислот или на другую аминокислоту, на дериватизированную или замещенную аминокислоту с дополнительными требуемыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментативному расщеплению, или на D-аминокислоту, или замену на другую молекулу или соединение, такое как углевод, которое имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; делецию аминокислоты; вставку аминокислоты, используя одну из двадцати общеизвестных аминокислот или другую аминокислоту, дериватизированную или замещенную аминокислоту с дополнительными требуемыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментативному расщеплению, или D-аминокислоту, или замену на другую молекулу или соединение, такое как углевод, которое имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; или замену на другую молекулу или соединение, такое как углевод или мономер нуклеиновой кислоты, который имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида. Пептиды могут быть также модифицированы путем ацетилирования или амидирования.

Синтез производных ингибирующих пептидов может основываться на известных методах биосинтеза пептидов, биосинтеза углеводов и других подобных методах. В качестве отправного пункта, специалист может использовать подходящую компьютерную программу для определения конформации исследуемого пептида. После выяснения конформации раскрытого в изобретении пептида, специалист может определить с помощью рационального способа проектирования, какой вид замещений может быть осуществлен в одном или более сайтах для получения производного, которое сохраняет основную конформацию и распределение заряда исходного пептида, но которое может обладать характеристиками, которые не присутствуют или которые улучшаются по сравнению с характеристиками, обнаруживаемыми в исходном пептиде. После идентификации молекул перспективных производных, эти производные могут быть подвергнуты испытаниям для определения возможности их применения в качестве MASP-2 ингибирующих средств, используя описанные в изобретении методы исследования.

Скрининг пептидов, ингибирующих MASP-2.

Можно также использовать моделирование на молекулярном уровне и рациональный молекулярный дизайн для образования и скрининга пептидов, которые имитируют молекулярные структуры ключевых связывающих участков MASP-2 и ингибируют MASP-2 зависимую активность комплемента. Молекулярные структуры, используемые для моделирования, включают CDR участки моноклональных антител против MASP-2, а также таргетные участки, по поводу которых известно, что они являются важными для функционирования MASP-2, в том числе участок, необходимый для димеризации, участок, вовлеченный в связывание с MBL, и ранее описанный активный сайт серин-протеазы. Методы идентификации пептидов, которые связываются с конкретной мишенью, хорошо известны. Например, для вновь конструируемых макромолекулярных структур, таких как пептиды, которые связываются с конкретной молекулой, может быть использован молекулярный импринтинг. Смотрите, например, публикацию Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites," *TRIP* 2(5) 1994.

В качестве иллюстративного примера, один метод получения имитаторов MASP-2 связывающих пептидов заключается в следующем. Полимеризуют функциональные мономеры известного MASP-2 связывающего пептида или связывающего участка антитела против MASP-2, которое ингибирует MASP-2 (темплат). Затем темплат удаляют и проводят полимеризацию второго класса мономеров в пустом пространстве, оставшемся после удаления темплата, с получением новой молекулы, которая обладает одним

или более желательными свойствами, которые аналогичны свойствам теплата. Помимо получения пептидов, таким методом могут быть также получены другие MASP-2 связывающие молекулы, которые являются MASP-2 ингибирующими средствами, такие как полисахариды, нуклеозиды, лекарственные средства, нуклеопротеины, липопротеины, углеводы, гликопротеины, стероиды, липиды и другие биологически активные материалы. Этот метод применяют для конструирования большого числа биологических имитаторов, которые являются более стабильными, чем их природные аналоги, так как их обычно получают свободнорадикальной полимеризацией функциональных мономеров, приводящей к образованию соединения с не подверженный биохимическому разложению главной цепью.

Синтез пептидов.

MASP-2 ингибирующие пептиды могут быть получены хорошо известными методами, такими как метод твердофазного синтеза, впервые описанный в публикации Merrifield, в J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963. Может быть осуществлен автоматизированный синтез, используя, например, пептидный синтезатор Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Foster City, Calif.) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Описание других методов можно найти, например, в монографии Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, second edition, John Wiley & Sons, 1976, а также в других справочных изданиях, известных специалистам в этой области.

Пептиды также могут быть получены с использованием стандартных методов генной инженерии, известных специалистам в этой области. Например, пептид может быть получен ферментативным методом путем вставки нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, в экспрессионный вектор, экспрессирующий ДНК, и трансляции ДНК в пептид в присутствии необходимых аминокислот. Затем пептид очищают хроматографическим методом или методом электрофореза, или с помощью белка-носителя, который может быть слит с пептидом, а затем отщеплен от пептида путем вставки в экспрессирующий вектор синхронно с кодирующей пептид последовательностью, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-носитель. Слитый белок пептида может быть выделен хроматографическими, электрофоретическими или иммунологическими методами (такими как связывание со смолой через антитело против белка-носителя). Пептид может быть расщеплен химически или ферментативно, например, с помощью гидролаз.

MASP-2 ингибирующие пептиды, которые применяют в способе по изобретению, могут быть также продуцированы в рекомбинантных клетках-хозяина в соответствии с традиционными методами. Для экспрессии последовательности, кодирующей MASP-2 ингибирующий пептид, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, должна быть операционно связана с регуляторными последовательностями, которые контролируют транскрипционную экспрессию в экспрессирующем векторе, и затем введена в клетку-хозяина. Помимо транскрипционных регулирующих последовательностей, таких как промоторы и энхансеры, экспрессирующие векторы могут включать трансляционные регуляторные последовательности и маркерный ген, которые используются для отбора клеток, способных нести экспрессирующие векторы.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют MASP-2 ингибирующий пептид, могут быть синтезированы с помощью "генных машин", используя такие протоколы, как фосфорамидитный метод. Если требуется применение химически синтезированной двухцепочечной ДНК, например, при синтезе гена или его фрагмента, то каждую комплементарную цепь получают отдельно. Получение коротких генов (от 60 до 80 пар оснований) в техническом отношении быстро развивается и может быть осуществлено путем синтеза комплементарных цепей и затем их ренатурации. Для получения более длинных генов, синтетические гены (двухцепочечные) собирают в модульную форму из одноцепочечных фрагментов, которые имеют длину от 20 до 100 нуклеотидов. Обзоры по синтезу полинуклеотидов можно найти, например, в монографии Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, 1994; в публикациях Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; и Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA 87:633, 1990.

Низкомолекулярные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие средства представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, включающие природные и синтетические вещества, которые имеют низкую молекулярную массу, такие, например, как пептиды, пептидомиметики и непептидные ингибиторы (включая олигонуклеотиды и органические вещества). Низкомолекулярные ингибиторы MASP-2 могут быть получены на основе молекулярной структуры переменных участков антител против MASP-2.

Низкомолекулярные ингибиторы могут быть сконструированы и получены на основе кристаллической структуры MASP-2, используя метод компьютеризированной разработки и создания лекарственных средств (Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992). Была описана кристаллическая структура MASP-2 крысы (Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). При применении метода, описанного в публикации Kuntz et al., вводят координаты кристаллической структуры MASP-2 в компьютерную программу, такую как DOCK, которая на выходе выдает список низкомолекулярных структур с предполагаемой способностью связывания с MASP-2. Использование таких компьютерных программ хорошо известно специалистам в этой области. Например, кристаллическую структуру ингибитора протеазы HIV-1 использовали для идентификации уникальных непептидных лигандов, которые являются ингибиторами протеазы

HIV-1, путем оценки соответствия соединений из базы данных Cambridge Crystallographic database сайту связывания фермента, используя программу DOCK (Kuntz, LD., et al., J. Mol. Biol. W:269-288, 1982; DesJarlais, R.L, et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).

Список низкомолекулярных структур, идентифицированных при помощи компьютеризованного метода в качестве потенциальных ингибиторов MASP-2, подвергаются скринингу, используя анализ связывания MASP-2, как описано в примере 10. Низкомолекулярные соединения, относительно которых было обнаружено, что они связываются с MASP-2, затем подвергаются испытанию в функциональном исследовании, как это описано в примере 2, с целью определения их способности ингибировать MASP-2 зависящую активацию комплемента.

МАСР-2 растворимые рецепторы.

Считают, что к другим подходящим MASP-2 ингибирующим средствам также относятся растворимые рецепторы MASP-2, которые могут быть получены методами, хорошо известными обычному специалисту в этой области.

Ингибиторы экспрессии MASP-2.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения, MASP-2 ингибирующее средство представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2, способный ингибировать MASP-2 зависящую активацию комплемента. При практическом осуществлении этого аспекта изобретения, типичные ингибиторы экспрессии MASP-2 включают молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2 (такие как антисмысловая мРНК, антисмысловая ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды), MASP-2 рибозимы и молекулы РНК-интерференции MASP-2.

Молекулы антисмысловых РНК и ДНК непосредственно блокируют трансляцию мРНК MASP-2 посредством гибридизации с мРНК MASP-2 и предотвращения трансляции белка MASP-2. Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты может быть сконструирована с помощью целого ряда методов, но при условии, что она должна обладать способностью препятствовать экспрессии MASP-2. Например, молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты может быть сконструирована путем инвертирования кодирующего участка (или его части) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) относительно его нормальной ориентации при транскрипции, что позволяет осуществить транскрипцию его комплемента.

Обычно, молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты является практически тождественной, по меньшей мере, части таргетного гена или таргетных генов. Однако, для того чтобы ингибировать экспрессию, нуклеиновая кислота не обязательно должна быть абсолютно тождественной. Обычно, может использоваться более высокая гомология для того, чтобы компенсировать применение молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты с более короткой последовательностью. Минимальный процент тождественности обычно составляет не менее 65%, но более высокий процент тождественности может характеризоваться более эффективным подавлением экспрессии эндогенной последовательности.

Предпочтительным является процент тождественности, существенно превышающий 80%, и все же тождественность от 95% до абсолютной тождественности является наиболее предпочтительной.

Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты может не иметь такой же паттерн интрона или экзона, как у таргетного гена, и некодирующие сегменты таргетного гена могут быть также эффективны в достижении антисмыслового подавления таргетного гена, как и кодирующие сегменты. Последовательность ДНК по меньшей мере из 8 или более нуклеотидов может быть использована в качестве молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты, хотя предпочтительнее является более длинная последовательность. В настоящем изобретении, типичным примером применяемого MASP-2 ингибирующего средства является молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2, которая по меньшей мере на девяносто процентов тождественна комплементарной кДНК MASP-2, состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в SEQ ID NO: 4, кодирует белок MASP-2, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5.

Таргетирование антисмысловых олигонуклеотидов на связывание с мРНК MASP-2 представляет собой другой механизм, который может быть использован для понижения уровня синтеза белка MASP-2. Например, синтез полигалактуроназы и ацетилхолинового мускаринового рецептора второго типа ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на их соответствующие последовательности мРНК (патентные документы U.S. Patent No. 5739119, to Cheng, and U.S. Patent No. 5759829, to Shewmaker). Кроме того, были продемонстрированы примеры антисмыслового ингибирования с помощью ядерного белка циклина, гена множественной лекарственной резистентности (MDG1), ICAM-1, Е-селектина, STK-1, стриарного рецептора GABAA и EGF человека (см. например, патентные документы U.S. Patent No. 5801154, to Baracchini; U.S. Patent No. 5789573, to Baker; U.S. Patent No. 5718709, to Considine; and U.S. Patent No. 5610288, to Reubenstein).

Описана система, которая позволяет обычному специалисту определить, какие олигонуклеотиды могут применяться в изобретении, включающая зондирование подходящих сайтов в таргетной мРНК, используя расщепления рибонуклеазы H в качестве индикатора доступности последовательностей внутри транскриптов. Schegg, M., et al., Nucleic Acids Res. 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nucleic Acids Res. 29:3665-3673, 2001. Смесь антисмысловых олигонуклеотидов, которые являются комплементарными по

отношению к конкретным участкам транскрипта MASP-2, добавляют к экстрактам клеток, экспрессирующим MASP-2, таким как гепатоциты, и подвергают гибридизации для создания восприимчивых к рибонуклеазе H сайтов. Этот способ может быть объединен с выбором последовательностей с помощью компьютерной программы, которая может предсказывать оптимальный выбор последовательности для антисмысловых композиций на основе их относительной способности образовывать димеры, "шпильки" или другие вторичные структуры, которые могут уменьшать или предотвращать специфическое связывание с таргетной мРНК в клетке-хозяине. Анализ этих вторичных структур и рекомендации по выбору таргетных сайтов могут быть осуществлены с помощью программного обеспечения OLIGO для анализа праймеров (Rychlik, I., 1997) и компьютерного алгоритма BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F, et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Предпочтительно, чтобы антисмысловые соединения, направленные на таргетную последовательность, включали приблизительно от 8 до 50 нуклеотидов. Антисмысловые олигонуклеотиды, включающие приблизительно от 9 до 35 нуклеотидов или около этого, являются особенно предпочтительными. Авторы изобретения предполагают, что все олигонуклеотидные композиции в диапазоне от 9 до 35 нуклеотидов (то есть те, которые включают 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 или около этого) являются наиболее предпочтительными для практического использования способов по изобретению, основанных на антисмысловых олигонуклеотидах. Наиболее предпочтительными таргетными участками мРНК MASP-2 являются те, которые расположены в непосредственной близости от кодона, инициирующего трансляции AUG, и те последовательности, которые являются фактически комплементарными с 5' участками мРНК, например, между -10 и +10 участками нуклеотидной последовательности гена MASP-2 (SEQ ID NO: 4). Примеры ингибиторов экспрессии MASP-2 представлены в табл. 4.

Таблица 4

Примеры ингибиторов экспрессии MASP-2

SEQ ID NO:30 (нуклеотиды 22-680 последовательности SEQ ID NO:4)	Последовательность нуклеиновой кислоты кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4), кодирующая CUBIEGF
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGC3	Нуклеотиды 12-45 последовательности SEQ ID NO:4, включая стартовый сайт трансляции MASP-2 (смысловой)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACSTTCCGCTCCGACTCC AACGAGAAG3'	Нуклеотиды 361-396 последовательности SEQ ID NO:4, кодирующей участок, который содержит связывающий сайт MBL MASP-2 (смысловой)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3'	Нуклеотиды 610-642 последовательности SEQ ID NO:4, кодирующей участок, который содержит домен CUBII

Как было отмечено выше, используемый в изобретении термин "олигонуклеотид" относится к любому олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или к их имитаторам. Этот термин также охватывает олигонуклеотидные основания, состоящие из природных нуклеотидов, Сахаров и ковалентных межнуклеозидных (каркасных) связей, а также олигонуклеотиды с неприродными модификациями. Эти модификации позволяют наделять олигонуклеотиды определенными желательными свойствами, которыми не обладают природные олигонуклеотиды, такими как пониженные токсические свойства, повышенная устойчивость к деградации нуклеазы и повышенное поглощение клетками. В иллюстративных вариантах осуществления, антисмысловые соединения по изобретению отличаются от нативной ДНК модификацией фосфодиэфирного каркаса для увеличения срока службы антисмыслового олигонуклеотида, в котором фосфатные заместители заменены на фосфоротионатные. Аналогичным образом, один или оба конца олигонуклеотида могут быть замещены одним или более производными акридина, которые интеркалируют между соседними парами нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты.

Другой альтернативой антисенсу является использование "РНК интерференции" (RNAi). Двухцепочные РНК (dsRNA) могут провоцировать сайленсинг гена у млекопитающих *in vivo*. По-видимому, природной функцией RNAi и косупрессии является защита генома от инвазии мобильными генетическими элементами, такими как ретротранспозоны и вирусы, которые продуцируют aberrантные РНК или dsRNA в клетке-хозяине, когда они становятся активными (см. например, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999). Молекула двухцепочной РНК может быть получена синтезом двух цепей РНК, способных к формированию молекулы двухцепочной РНК, каждая из которых имеет длину приблизительно от 19 до 25 нуклеотидов (например, 19-23 нуклеотидов). Например, молекула dsRNA, применяемая в способах по изобретению, может включать РНК, соответствующую последовательности и ее комплементу, приведенным в табл. 4. Предпочтительно, чтобы, по меньшей мере одна цепь РНК имела 3' "липкий" конец от 1-5 нуклеотидов. Синтезированные цепи РНК объединяют в условиях, при которых образуют двухцепочную молекулу. Последовательность РНК может включать, по меньшей мере, восьминуклеотидную часть из последовательности SEQ ID NO: 4 с общей длиной в 25 нуклеотидов или менее. Конструирование последовательностей siRNA для данной мишени хорошо известно обычному специалисту в этой области. Су-

ществуют коммерческие организации, занимающиеся конструированием последовательностей siRNA и гарантирующие по меньшей мере 70% нокдаун экспрессии гена (Qiagen, Valencia, Calif).

dsRNA может быть введена в форме фармацевтической композиции и известными методами, с помощью которых нуклеиновую кислоту вводят в требуемую клетку-мишень. Общепринятые способы переноса гена включают фосфат кальция, DEAE-декстран, электропорацию, микроинъекцию и вирусные методы. Такие методы описаны в публикации Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Рибозимы, такие как рибозимы, которые таргетируют мРНК MASP-2, могут быть также использованы для снижения количества и/или биологической активности MASP-2. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, способные расщеплять молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, которая полностью или частично гомологична последовательности рибозима. Существует возможность конструирования рибозимных трансгенов, кодирующих рибозимы РНК, которые специфически образуют пары с таргетной РНК и расщепляют фосфодиэфирный каркас в специфическом участке, вследствие чего происходит функциональная инактивация таргетной РНК. При проведении этого расщепления, рибозим сам по себе не изменяется, в результате чего он сохраняет способность к рециклингу и расщеплению других молекул. Включение рибозимных последовательностей в антисмысловые РНК обеспечивает им активность расщепления РНК, в результате чего повышается активность антисмысловых конструкций.

Рибозимы, используемые при практическом осуществлении изобретения, обычно включают гибридирующий участок по меньшей мере из девяти нуклеотидов, который является в нуклеотидной последовательности комплементарным, по меньшей мере, к части таргетной мРНК MASP-2, и каталитический участок, который предназначен для расщепления таргетной мРНК MASP-2, (см. в целом, патентные документы EPA No. 0321201; WO88/04300; публикации Haseloff, J., et al., *Nature* 334:585 591, 1988; Fedor, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1668 1672, 1990; Cech, T.R., et al., *Ann. Rev. Biochem.* 55:599 629, 1986).

Рибозимы также могут быть непосредственно таргетированы на клетки в форме олигонуклеотидов РНК, инкорпорирующих последовательности РНК или вводимых в клетку в качестве экспрессирующего вектора, кодирующего требуемую рибозимальную РНК. Рибозимы могут использоваться и применяться почти таким же способом, как способ, описанный для антисмысловых полинуклеотидов.

Антисмысловые РНК и ДНК, рибозимы и молекулы RNAi, применяемые в способах по изобретению, могут быть получены любым известным методом синтеза молекул ДНК и РНК. Они включают хорошо известные методы химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, такие как, например, твердофазный фосфорамидитный химический синтез. В качестве варианта, молекулы РНК могут быть образованы путем транскрипции *in vitro* и *in vivo* последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антисмысловой РНК. Такие последовательности ДНК могут быть инкорпорированы в широкий спектр векторов, которые инкорпорируют подходящие промоторы полимеразы РНК, такие как T7 или SP6 промоторы полимеразы. В качестве варианта, конструкции антисмысловой кДНК, которые синтезируют антисмысловую РНК постоянно или индуцибельно, в зависимости от используемого промотора, могут стабильно вводиться в клеточные линии.

Хорошо известные различные модификации молекул ДНК могут быть введены для повышения стабильности и периода полувыведения. Применяемые модификации включают, но этим не ограничивая, добавление фланкирующих последовательностей рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов к 5' и/или 3' концам молекулы, или использование фосфотиоата или 2' О-метила вместо фосфодиэфирных связей с олигодезоксирибонуклеотидным каркасом.

VI. Фармацевтические композиции и способы доставки. Дозирование.

В другом аспекте в изобретении предлагаются композиции для ингибирования негативных последствий MASP-2 зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от описанного в изобретении заболевания или состояния, включающего введение субъекту композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2 ингибирующее средство и фармацевтически приемлемый носитель. MASP-2 ингибирующие средства могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом, в терапевтически эффективных дозах для лечения или облегчения состояний, связанных с MASP-2 зависимой активацией комплемента. Терапевтически эффективная доза относится к количеству MASP-2 ингибирующего средства, достаточному для достижения облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

Токсичность и терапевтическая эффективность MASP-2 ингибирующих средств может быть определена стандартными фармацевтическими методами с использованием экспериментальных животных моделей, таких как экспериментальная модель на MASP-2-/- мышах, экспрессирующих человеческий трансген MASP-2, как описано в примере 1. Используя такие экспериментальные модели на животных, можно определить стандартными методами уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL) и минимальную эффективную дозу (MED). Отношение доз, которыми характеризуются NOAEL и MED, представляет собой терапевтический индекс, которые выражается как отношение NOAEL/MED. MASP-2 ингибирующие средства, которые имеют высокие терапевтические индексы, являются наиболее предпочтительными. Данные, полученные в результате изучения клеточных культур и

исследований на животных, могут быть использованы для определения диапазона доз для человека. Предпочтительно, чтобы дозы MASP-2 ингибирующего средства находились в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают MED при минимальном уровне или полным отсутствием токсичности. Доза может варьироваться внутри этого диапазона в зависимости от лекарственной формы или используемого способа введения.

Для любой лекарственной формы соединения, терапевтически эффективная доза может быть определена на экспериментальных моделях на животных. Например, на экспериментальной модели на животном может быть определена доза, при которой достигается диапазон циркулирующей концентрации в плазме, который включает в себя MED. Количественные уровни MASP-2 ингибирующего средства в плазме могут также быть определены, например, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнении к токсикологическим исследованиям, эффективная доза также может быть оценена по количеству MASP-2 белка, присутствующему в живом организме, и по аффинности связывания MASP-2 ингибирующего средства. Было показано, что уровни MASP-2 присутствуют в сыворотке здоровых людей в небольших количествах в пределах 500 нг/мл, и уровни MASP-2 у конкретных субъектов могут быть определены методом количественного анализа MASP-2, описанным в публикации Moller-Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods* 282:159-167, 2003.

Обычно, доза вводимых композиций, включающих MASP-2 ингибирующие средства, варьируют в зависимости от таких факторов, как возраст, масса тела, рост, пол субъекта, его общее состояние здоровья и анамнез. В качестве иллюстрации, MASP-2 ингибирующие средства, такие как антитела против MASP-2, могут быть введены в дозе приблизительно от 0,010 до 10,0 мг/кг, предпочтительно, от 0,010 до 1,0 мг/кг, более предпочтительно, от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает комбинацию антитела против MASP-2 и MASP-2 ингибирующих пептидов.

Терапевтическая эффективность MASP-2 ингибирующих композиций и способов по настоящему изобретению для данного субъекта и соответствующие дозы могут быть определены путем исследований комплемента, которые хорошо известны специалистам в этой области. Комплемент генерирует множество специфических продуктов. В течение последних десяти лет были разработаны чувствительные и специфические методы анализа, которые являются коммерчески доступными для большинства из этих продуктов активации, в том числе малых фрагментов активации C3a, C4a и C5a и больших фрагментов активации iC3b, C4d, Bb и sC5b-9. В большинстве из этих исследований используются моноклональные антитела, которые реагируют с новыми антигенами (неоантигенами), доступными на фрагменте, но не на нативных белках, из которых они образуются, что делает эти методы анализа очень простыми и специфичными. Чаще всего применяют твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), хотя иногда все еще используют радиоиммунологический анализ для C3a и C5a. В этом последнем методе измеряют как непротесированные фрагменты, так и их фрагменты 'desArg', которые являются основными формами, обнаруживаемыми в кровотоке. Непротесированные фрагменты и C5adesArg быстро выводятся за счет связывания с рецепторами клеточной поверхности и, поэтому, присутствуют в очень низких концентрациях, тогда как C3adesArg не связывается с клетками и аккумулируется в плазме. Измерение C3a является чувствительным, не зависимым от пути активации комплемента индикатором активации комплемента. Альтернативный путь активации комплемента может быть оценен путем измерения фрагмента Bb. Обнаружение жидкофазного продукта мембраноатакующего пути активации, sC5b-9, является доказательством того, что комплемент активирован полностью. Так как оба пути активации, и лектиновый и классический, генерируют одни и те же продукты активации, C4a и C4d, измерение этих двух фрагментов не дает никакой информации по поводу того, какой из этих двух путей активации комплемента привел к образованию продуктов активации.

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

Дополнительные лекарственные средства.

Композиции и способы, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут необязательно включать одно или более дополнительных терапевтических средств, которые могут повышать активность MASP-2 ингибирующего средства или которые оказывают близкие терапевтические воздействия аддитивно или с синергизмом. Например, в случае лечения субъекта, страдающего от ТТР, когда у субъекта достигается положительный ответ на лечение ингибитором ADAM-TS13, одно или более MASP-2 ингибирующих средств могут быть введены в комбинации (в том числе совместно) с одним или более иммунодепрессивными средствами. Подходящие иммунодепрессивные средства включают кортикостероиды, ритуксан, циклоспорин и другие подобные иммунодепрессанты. В случае лечения субъекта, страдающе-

го от HUS или aHUS, или подверженного риску развития HUS или aHUS, одно или более MASP-2 ингибирующих средств могут быть введены в комбинации (в том числе совместно) с подходящим антибиотиком. В случае лечения субъекта, страдающего от aHUS, или подверженного риску развития aHUS, одно или более MASP-2 ингибирующих средств могут быть введены в комбинации (в том числе совместно) с другими ингибирующими комплемент средствами, такими как экулизумаб (Soliris), TT-30, антитело к фактору В, или другими средствами, которые ингибируют терминальные компоненты комплемента или амплификацию альтернативного пути.

Для достижения требуемого терапевтического результата следует определиться с включением и выбором дополнительного средства (дополнительных средств). В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее средство может быть введено в комбинации с одним или более противовоспалительными и/или болеутоляющими средствами. Подходящие противовоспалительные и/или болеутоляющие средства включают антагонисты серотонинового рецептора; агонисты серотонинового рецептора; антагонисты гистаминового рецептора; антагонисты брадикининового рецептора; ингибиторы калликрейна; антагонисты тахикенинового рецептора, включая антагонисты подтипа рецепторов нейрокинина-1 и нейрокинина-2; антагонисты рецептора кальцитонин-ген-связанного пептида (CGRP); антагонисты интерлейкинового рецептора; ингибиторы ферментов, активных при синтетическом пути активации для метаболитов арахидоновой кислоты, включая ингибиторы фосфолипазы, включая ингибиторы изоформы PLA2 и ингибиторы изоформы PLC γ , ингибиторы циклооксигеназы (COX) (которые могут представлять собой либо COX-1, COX-2, либо неселективные ингибиторы COX-1 и COX-2), ингибиторы липооксигеназы; антагонисты простагландинных рецепторов, включая антагонисты подтипа рецепторов эйкозаноидов EP-1 и EP-4 и антагонисты подтипа рецепторов тромбоксана; антагонисты рецептора лейкотриена, включая антагонисты подтипа рецепторов лейкотриена B4 и лейкотриена D4; агонисты опиоидного рецептора, включая агонисты подтипа рецепторов μ -опиоида, δ -опиоида и κ -опиоида; агонисты и антагонисты пуриnergического рецептора, включая антагонисты рецептора P2X и агонисты рецептора P2Y; чувствительные к аденозинтрифосфату (ATP) вещества, открывающие калиевые каналы; ингибиторы MAP киназы; ингибиторы холиномиметического ацетилхолина; и агонисты альфа-адренергического рецептора (включая альфа-1, альфа-2 и неселективные альфа-1 и альфа-2 агонисты).

MASP-2 ингибирующие средства по настоящему изобретению могут быть введены в комбинации с одним или более другими ингибиторами комплемента, такими как ингибитор C5. В настоящее время, экулизумаб (Solaris®), антитело против C5, является единственным комплемент-таргетированным лекарственным средством, которое было одобрено для применения на людях. Однако, было показано, что фармакологические средства блокируют комплемент *in vivo*. K76COOH и нафамстат мезилат представляют собой два лекарственных средства, которые продемонстрировали определенную эффективность в экспериментальных моделях трансплантации на животных (Miyagawa, S., et al., Transplant Proc. 24:483-484, 1992). Было также показано, что низкомолекулярные гепарины являются эффективными при регуляции активации комплемента (Edens, R.E., et al., Complement Today, pp.96-120, Basel: Karger, 1993). Считают, что эти низкомолекулярные ингибиторы могут применяться в качестве лекарственных средств при использовании в комбинации с MASP-2 ингибирующими средствами по настоящему изобретению.

В комбинации с MASP-2 ингибирующими средствами по настоящему изобретению могут применяться и другие природные ингибиторы комплемента. Биологические ингибиторы комплемента включают растворимый фактор комплемента 1 (sCR1). Он представляет собой природный ингибитор, который обнаруживается в наружной мембране человеческих клеток. Другие мембранные ингибиторы включают мембранные ингибиторы DAF, MCP и CD59. Рекombинантные формы были подвергнуты испытаниям на их антикомплементарную активность *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что sCR1 является эффективным при ксенотрансплантации, когда система комплемента (как альтернативная, так и классическая) инициирует возникновение синдрома гиперактивного отторжения в течение считанных минут перфузии крови в недавно пересаженном органе (Platt J.L., et al., Immunol. Today 11:450-6, 1990; Marino I.R., et al., Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., Transplantation 54:573-6, 1992). Применение sCR1 защищает и увеличивает время жизнеспособности трансплантированного органа, вовлекая путь активации комплемента в патогенез выживания органа (Leventhal, J. R. et al., Transplantation 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., Transplantation 57:363-70, 1994).

Подходящие дополнительные ингибиторы комплемента для использования в комбинации с композициями по настоящему изобретению также включают, например, MoAbs, такие как антитело против C5 (например, экулизумаб), разработанное фирмой Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, и MoAbs против пропердина.

Фармацевтические носители и системы доставки.

Обычно, композиции MASP-2 ингибирующих средств по настоящему изобретению, объединенные с любыми другими выбранными терапевтическими средствами, соответственно заключены в фармацевтически приемлемый носитель. Носитель является нетоксичным, биосовместимым, и его выбирают так, чтобы он отрицательно не влиял на биологическую активность MASP-2 ингибирующего средства (и любых других терапевтических средств, объединенных с ним). Примеры фармацевтически приемлемых

носителей для пептидов описаны в патентном документе U.S. Patent No. 5211657 to Yamada. Из антител против MASP-2 и ингибирующих пептидов, применяемых в изобретении, могут быть приготовлены твердые, полутвердые, гелеобразные, жидкие и газообразные лекарственные формы, такие как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, ингаляционные формы и инъекции для перорального, парентерального или хирургического введения. Изобретение также включает местное введение композиций в результате нанесения покрытия из лекарственного средства на медицинские устройства и другие подобные инструменты.

Подходящие носители для парентеральной доставки путем инъекции, инфузии или промывания и местной доставки включают дистиллированную воду, забуференный фосфатом физиологический раствор, нормальный или лактированный раствор Рингера, раствор декстрозы, раствор Ханка или пропандиол. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды могут быть использованы стерильные нелетучие масла. Для этой цели может использоваться любое биосовместимое масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в инъеклируемых препаратах находят применение жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Носитель и средство могут быть компаундированы в форме жидкости, суспензии, полимеризующегося или непolyмеризующегося геля, пасты или крема.

Носитель может также включать средство доставки, для того чтобы поддерживать установившийся режим доставки (то есть пролонгированный, замедленный или регулируемый) лекарственного средства (лекарственных средств) или для того чтобы интенсифицировать доставку, усвоение, повысить стабильность или улучшить фармакокинетику терапевтического средства (терапевтических средств). Такая система доставки может включать, но этим не ограничивая, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, сформированные из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие гидрогелевые и мицеллярные системы доставки включают сополимеры PEO:PHB:PEO (полиэтиленоксид: полигидроксibuтират:полиэтиленоксид) и комплексы сополимер/циклодекстрин, раскрытые в патентном документе WO 2004/009664 A2, и PEO и комплексы PEO/циклодекстрин, раскрытые в патентном документе U.S. Patent Application Publication No. 2002/0019369 A1. Такие гидрогели могут быть инъектированы местно в область предполагаемого воздействия, или подкожно или внутримышечно для образования депо с пролонгированным высвобождением лекарственного средства.

В случае внутрисуставной доставки, MASP-2 ингибирующее средство может быть перенесено в описанных выше инъеклируемых жидких или гелевых носителях, в описанных выше инъеклируемых средствах доставки с пролонгированным высвобождением лекарственного средства, или в гиалуроновой кислоте или в производном гиалуроновой кислоты.

В случае перорального введения непептидергических средств, MASP-2 ингибирующее средство может быть перенесено в инертном наполнителе или разбавителе, таком как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза.

В случае местного введения, MASP-2 ингибирующее средство может быть перенесено в мази, лосьоне, креме, геле, каплях, суппозитории, спрее, жидкости или порошке, или в гелевых или микрокапсулярных системах доставки с помощью трансдермального пластыря.

В настоящее время разрабатываются различные системы назальной и ингаляционной доставки, включающие аэрозоли, дозирующие ингаляторы, порошковые ингаляторы и небулайзеры, и они могут быть соответствующим образом приспособлены для доставки по настоящему изобретению при аэрозольной, ингаляционной или распыляемом средстве доставки соответственно.

В случае интратекальной (IT) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставки, для введения композиции по настоящему изобретению могут быть использованы соответствующим образом стерилизованные системы доставки (например, жидкости, гели, суспензии и так далее).

Композиции по настоящему изобретению могут также включать биосовместимые вспомогательные вещества, такие как диспергирующие или смачивающие вещества, суспендирующие вещества, разбавители, буферы, вещества, способствующие проникновению, эмульгаторы, связующие вещества, загустители, ароматизирующие вещества (для перорального введения).

Фармацевтические носители для антител и пептидов.

Более конкретно, применительно к антителам против MASP-2 и ингибирующим пептидам, предлагаются примеры лекарственных форм, которые могут быть парентерально введены в виде инъеклируемых доз раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масла, физиологический раствор, глицерин или этанол. Кроме того, в композициях, включающих антитела против MASP-2 и ингибирующие пептиды, могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества или эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, буферные вещества и другие подобные вспомогательные вещества. Дополнительные компоненты фармацевтических композиций включают вазелиновое масло (животного, растительного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. Обычно, предпочтительными жидкими носителями для инъеклируемых растворов являются глицерин, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Антитела против MASP-2 и ингибирующие пептиды могут быть также введены в форме инъекци-

руемого депо или имплантируемого препарата, которые могут быть приготовлены так, что они обеспечивают пролонгированное или пульсирующее высвобождение действующих средств.

Фармацевтически приемлемые носители для ингибиторов экспрессии.

Более конкретно, применительно к ингибиторам экспрессии, применяемым в способах по изобретению, предлагаются композиции, которые включают описанный выше ингибитор экспрессии и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Композиция может дополнительно включать коллоидно-дисперсную систему.

Фармацевтические композиции, которые включают ингибиторы экспрессии, могут включать, но этим не ограничивая, растворы, эмульсии, и составы, содержащие липосомы. Эти композиции могут быть приготовлены из различных компонентов, которые включают, но этим не ограничивая, заранее подготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Приготовление таких композиций обычно включает смешение ингибитора экспрессии с одним или более из следующих веществ: буферами, антиоксидантами, низкомолекулярными полипептидами, белками, аминокислотами, углеводами, включая глюкозу, сахаразу или декстрины, хелатообразующими реагентами, такими как EDTA, глутатионом и другими стабилизаторами и вспомогательными веществами. Примерами подходящих разбавителей являются нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены и приготовлены в форме эмульсий, которые обычно представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой жидкости в форме капель (см. Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Примеры природных эмульгаторов, используемых в эмульсионных лекарственных формах, включают аравийскую камедь, пчелиный воск, ланолин, лецитин и фосфатиды.

В одном варианте осуществления композиции, включающие нуклеиновые кислоты, могут быть приготовлены в форме микроэмульсий. Микроэмульсия, используемая в изобретении, относится к системе воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой простой оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см. Rosoff in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1). В способе по изобретению могут также использоваться липосомы для переноса и доставки антисмысловых олигонуклеотидов в требуемое место.

Фармацевтические композиции и лекарственные формы ингибиторов экспрессии для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть использованы традиционные фармацевтические носители, а также водные, порошковые или масляные основы и загустители и другие подобные вещества.

Способы введения.

Фармацевтические композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут быть введены различными способами, в зависимости от того, какой способ введения, местный или системный, в наибольшей степени соответствует состоянию, подвергаемому лечению. Кроме того, как описано в изобретении выше по поводу методов экстракорпоральной реперфузии, MASP-2 ингибирующие средства могут быть введены путем введения композиций по настоящему изобретению в циркулирующую кровь или плазму. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут быть доставлены путем нанесения покрытия на имплантируемое медицинское устройство или путем введения композиций внутрь имплантируемого медицинского устройства.

Системная доставка.

Предполагается, что используемые в изобретении термины "системная доставка" и "системное введение" включают, но этим не ограничивая, пероральные и парентеральные способы, в том числе внутримышечный (IM), подкожный, внутривенный (IV), внутриартериальный, ингаляционный, сублингвальный, буккальный, местный, трансдермальный, назальный, ректальный, вагинальный и другие способы введения, которые позволяют достигать эффективного диспергирования доставляемого средства в одном или нескольких местах предполагаемого терапевтического действия. Предпочтительные способы системной доставки композиций по настоящему изобретению включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и ингаляционный способ. Следует иметь в виду, что соответствующий способ системного введения для выбранных средств, используемых в конкретных композициях по настоящему изобретению, должен определяться, в том числе, с учетом предрасположенности лекарственного средства к путям метаболических трансформаций, связанных с данным способом введения. Например, пептидергические средства наиболее удобно вводить непероральными способами.

MASP-2 ингибирующие антитела и полипептиды могут быть доставлены субъекту, нуждающемуся в этом, любыми подходящими способами. Способы доставки MASP-2 антител и полипептидов включают введение пероральным, пульмональным, парентеральным (например, внутримышечной, интраперитонеальной, внутривенной (IV) или подкожной инъекцией), ингаляционным (например, в форме тонкодисперсного порошка), трансдермальным, назальным, вагинальным, ректальным или сублингвальным способами введения, и из них могут быть приготовлены лекарственные формы, соответствующие каждому из способов введения.

В качестве типичного примера, MASP-2 ингибирующие антитела и пептиды могут быть введены в живой организм путем нанесения на мембрану организма, способную абсорбировать полипептиды, например, на назальные, гастроинтестинальные и ректальные мембраны. Полипептиды обычно наносят на абсорбирующую мембрану в сочетании с усиливающим проникновение веществом (см. например, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, 1988; Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release* 13:241, 1990.) Например, STDHF является синтетическим производным фусидовой кислоты, стероидного поверхностно-активного вещества, которое аналогично по структуре солям желчных кислот, и это производное было использовано в качестве усиливающего проникновения вещества для назальной доставки (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dec. 1990).

MASP-2 ингибирующие антитела и полипептиды могут быть введены совместно с другой молекулой, такой как липид, для защиты полипептидов от ферментативной деградации. Например, ковалентное присоединение полимеров, в частности, полиэтиленгликоля (PEG), использовали для защиты конкретных белков от ферментативного гидролиза в организме и таким образом увеличивали продолжительность периода полувыведения (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Сообщалось о многих полимерных системах для доставки белка (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

Недавно, были созданы липосомы с повышенной сывороточной стабильностью и повышенными полупериодами циркуляции (см. например, патентный документ U.S. Patent No. 5741516, to Webb). Кроме того, были опубликованы обзоры различных методов получения липосомных и липосомоподобных препаратов, используемых в качестве перспективных носителей лекарственных средств (см. например, патентные документы U.S. Patent No. 5567434, to Szoka; U.S. Patent No. 5552157, to Yagi; U.S. Patent No. 5565213, to Nakamori; U.S. Patent No. 5738868, to Shinkarenko; и U.S. Patent No. 5795587, to Gao).

В случае трансдермального применения, MASP-2 ингибирующие антитела и полипептиды могут быть объединены с другими подходящими ингредиентами, такими как носители и/или вспомогательные вещества. На свойства таких других ингредиентов не накладываются каких-либо ограничений, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми для их предполагаемого введения, и они не способны ослаблять действие активных ингредиентов композиции. Примеры подходящих средств включают мази, кремы, гели или суспензии в присутствии или отсутствии очищенного коллагена. MASP-2 ингибирующими антителами и полипептидами, предпочтительно, в жидкой или полужидкой форме, могут быть также пропитаны трансдермальные пластыри, наклейки и повязки.

Композиции по настоящему изобретению могут периодически системно вводиться с определенными интервалами для поддержания требуемого уровня терапевтического эффекта. Например, композиции могут быть введены, например, путем подкожной инъекции, один раз в две или четыре недели, или с менее частыми интервалами. Режим дозирования должен определять лечащий врач с учетом различных факторов, которые могут влиять на действие комбинации лекарственных средств. Эти факторы могут включать степень прогрессирования состояния, подвергаемого лечению, возраст, пол и массу тела пациента, и другие клинические факторы. Доза для каждого индивидуального лекарственного средства может варьировать в зависимости от MASP-2 ингибирующего средства, которое включено в композицию, а также от наличия и природы носителя для доставки лекарственного средства (например, носителя для доставки с пролонгированным высвобождением лекарственного средства). Кроме того, величина дозы может быть скорректирована с учетом изменения частоты введения и фармакокинетических свойств доставляемого лекарственного средства (лекарственных средств).

Местная доставка.

Используемый в изобретении термин "местное" включает в себя применение лекарственного средства в месте или вблизи места предполагаемого локализованного действия, и этот термин может включать, например, местную доставку в кожу или в другие пораженные ткани, офтальмическую доставку, интратекальное (IT), интрацеребровентрикулярное (ICV), интраартикулярное, внутримышечное, интракраниальное или внутримышечное введение, внесение или промывание. Местное введение может быть предпочтительным в случаях, когда требуется введение низкой дозы, предотвращение системных побочных эффектов и более точное регулирование интервалов доставки доз и концентрации действующих лекарственных средств в месте доставки. Местное введение обеспечивает создание заданной концентрации в целевом месте, вне зависимости от межиндивидуальных колебаний в метаболизме, кровотоке и так далее. Способ прямой доставки также позволяет лучше регулировать дозирование.

Местная доставка MASP-2 ингибирующего средства может быть осуществлена в процессе использования хирургических методов лечения заболевания или состояния, например, в процессе проведения таких процедур, как артериальное шунтирование, атерэктомия, лазерные процедуры, ультразвуковые процедуры, баллонная ангиопластика и установка стента. Например, ингибитор MASP-2 может быть введен субъекту одновременно с проведением баллонной ангиопластики. Баллонная ангиопластика

включает введение катетера со спущенным баллоном, в артерию. Спущенный баллон устанавливают в непосредственной близости от атеросклеротической бляшки и надувают его, для того чтобы прижать бляшку вплотную к стенке сосуда. В результате, поверхность баллона соприкасается со слоем клеток эндотелия сосудов на поверхности кровеносного сосуда. MASP-2 ингибирующее средство может быть прикреплено к катетеру баллонной ангиопластики таким способом, который обеспечивает высвобождение лекарственного средства в месте нахождения атеросклеротической бляшки. Лекарственное средство может быть прикреплено к баллонному катетеру хорошо известными стандартными методами. Например, средство может храниться во внутреннем пространстве баллонного катетера до тех пор, пока баллон не начинают надувать, в результате чего средство высвобождается в местную окружающую среду. В качестве варианта, поверхность баллона может быть импрегнирована лекарственным средством, в результате чего лекарственное средство контактирует с клетками стенки артерии при надувании баллона. Средство может быть также доставлено в перфорированном баллонном катетере, таком, как описанный в публикации Flugelman, M.Y., et al., *Circulation* 85:1110-1117, 1992. См. также опубликованный патентный документ PCT Application WO 95/23161 в качестве примера прикрепления терапевтического белка к катетеру баллонной ангиопластики. Аналогично, MASP-2 ингибирующее средство может быть введено в гель или полимерное покрытие, наносимое на стент, или может быть введено в материал стента, вследствие чего стент выделяет MASP-2 ингибирующее средство после установки в сосудах.

MASP-2 ингибирующие композиции, применяемые при лечении артритов и других скелетно-мышечных нарушений, могут быть местно доставлены путем внутрисуставной инъекции. Удобно, если такие композиции могут включать носитель доставки с пролонгированным высвобождением. В качестве дополнительного примера случаев, при которых может потребоваться местная доставка, являются случаи, когда MASP-2 ингибирующие композиции, применяемые при лечении урогенитальных состояний, могут быть соответствующим образом инстиллированы в мочевого пузырь или во внутрь другой урогенитальной структуры.

Нанесение покрытий на медицинское устройство.

MASP-2 ингибирующие средства, такие как антитела и ингибирующие пептиды, могут быть иммобилизованы на (или внутри) поверхности имплантируемого или прикрепляемого медицинского устройства. Модифицированная поверхность обычно находится в контакте с живой тканью после имплантации в организм животного. Под "имплантируемым или прикрепляемым медицинским устройством" подразумевается любое устройство, которое имплантируют внутрь ткани или прикрепляют к ткани организма животного, при нормальной работе устройства (например, стентов и имплантируемых устройств доставки лекарственных средств). Такие имплантируемые или прикрепляемые медицинские устройства могут быть изготовлены, например, из нитроцеллюлозы, диазоцеллюлозы, стекла, полистирола, поливинилхлорида, полипропилена, полиэтилена, декстрана, сефарозы, агара, крахмала, нейлона, нержавеющей стали, титана и биоразлагаемых и/или биосовместимых полимеров. Связь белка с устройством может быть осуществлена любым методом, который не нарушает биологической активности связанного белка, например, путем присоединения одного или обоих N-терминальных и C-терминальных остатков белка к устройству. Присоединение может быть также осуществлено в одном или более внутренних участках в белке. Могут быть также использованы множественные присоединения (как внутренние, так и на концах белка). Поверхность имплантируемого или прикрепляемого медицинского устройства может быть модифицирована с целью введения функциональных групп (например, карбоксильной, амидной, аминной, эфирной, гидроксильной, цианидной, нитридной, сульфаниламидной, ацетилиновой, эпоксидной, силановой, ангидридной, сукцинимидной, азидной) для иммобилизации на ней белка. Методы химического взаимодействия включают, но этим не ограничивая, образование производных сложных эфиров, простых эфиров, амидов, азидных и сульфаниламидных производных, цианатных и других связей с функциональными группами, доступными на MASP-2 антителах или ингибирующих пептидах. MASP-2 антитела или ингибирующие фрагменты могут быть также нековалентно присоединены путем добавления к белку последовательности аффинной метки, такой как GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, *Gene* 67:31, 1988), полигистидины (E. Hochuli et al., *J. Chromatog.* 411:77, 1987), или биотин. Такие аффинные метки могут быть использованы для обратимого присоединения белка к устройству.

Белки могут быть также ковалентно присоединены к поверхности корпуса устройства, например, путем ковалентной активации поверхности медицинского устройства. В качестве типичного примера, матрично-клеточный белок (белки) может быть присоединен к корпусу устройства с помощью любой из следующих пар реакционно-способных групп (при этом один представитель пары присутствует на поверхности корпуса устройства, а второй представитель пары присутствует на матрично-клеточном белке (белках)): гидроксильная группа/группа карбоновой кислоты с образованием эфирной связи; гидроксильная группа/ангидридная группа с образованием эфирной связи; гидроксильная группа/изоцианатная группа с образованием уретановой связи. Поверхность корпуса устройства, которая не обладает подходящими реакционноспособными группами, может быть обработана путем травления плазмой, образующей высокочастотным разрядом (RFGD), для образования реакционноспособных групп, для того чтобы сделать возможным отложение матрично-клеточного белка (белков) (например, обработкой с помощью кислородной плазмы для введения кислородсодержащих групп; обработкой с помощью пропиламинно-

вой плазмой для введения аминокислот).

MASP-2 ингибирующие средства, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, такие как антисмысловые RNAi- или ДНК-кодирующие пептидные ингибиторы, могут быть заключены в пористые матрицы, присоединенные к корпусу устройства. Типичными пористыми матрицами, используемыми для создания поверхностного слоя, являются матрицы, приготовленные из коллагена сухожилий или кожи, производимыми и поставляемыми рядом фирм (например, фирмой Sigma and Collagen Corporation), или коллагеновые матрицы, полученные, как описано в патентных документах U.S. Patent Nos. 4394370, to Jefferies, и 4975527, to Koezuka. Один коллагеновый материал имеет название UltraFiber™, и он производится фирмой Norian Corp. (Mountain View, California).

При желании, могут быть также использованы конкретные полимерные матрицы, которые включают полимеры акрилового эфира и полимеры молочной кислоты, описанные, например, в патентных документах U.S. Patent Nos. 4526909 и 4563489, to Urist. Конкретными примерами подходящих полимеров являются полимеры ортоэфиров, ангидридов, сополимеры пропилен с фумаратом или полимер одного или более мономеров α -гидроксикарбоновой кислоты, (например, α -гидроксипропановой кислоты (гликолевой кислоты) и/или α -гидроксипропионовой кислоты (молочной кислоты)).

Схемы лечения.

При профилактическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, подверженному состоянию, связанному с MASP-2 зависимой активацией комплемента, или подверженному риску возникновения состояния, связанного с MASP-2 зависимой активацией комплемента, в количестве, достаточном для исключения или снижения риска развития симптомов состояния. При терапевтическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, по поводу которого есть подозрения в наличии у него состояния, связанного с MASP-2 зависимой активацией комплемента, или который уже страдает от состояния, связанного с MASP-2 зависимой активацией комплемента, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или, по меньшей мере, частичного облегчения симптомов состояния. В случае как профилактических, так и терапевтических схем лечения, композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут вводиться несколькими дозами до тех пор, пока у субъекта не будет достигнут соответствующий терапевтический результат. Применение MASP-2 ингибирующих композиций по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции или ограниченного количества последовательных введений для лечения острого состояния, например, реперфузионного повреждения или другого травматического повреждения. В качестве варианта, композиция может вводиться в определенные периоды времени в течение продолжительного периода для лечения хронических состояний, например, артритов или псориазиса.

Способы и композиции по настоящему изобретению могут применяться для ингибирования воспаления и родственных процессов, которые обычно возникают в результате диагностических и терапевтических лечебных и хирургических процедур. Для ингибирования таких процессов, MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может применяться перипроцедурально. Используемый в изобретении термин "перипроцедурально" относится к введению ингибирующей композиции до процедуры и/или во время процедуры и/или после процедуры, то есть до процедуры, до и во время процедуры, до и после процедуры, до, во время и после процедуры, или после процедуры. Перипроцедуральное применение может осуществляться путем местного введения композиции в место хирургического вмешательства или место проведения процедуры, например, путем инъекции или непрерывного, или периодического промывания места, или путем системного введения. Подходящие методы для местной перипроцедуральной доставки растворов MASP-2 ингибирующего средства описаны в патентных документах US Patent Nos. 6420432 to Demopoulos and 6645168 to Demopoulos. Подходящие методы для местной доставки хондропротекторных композиций, включающих MASP-2 ингибирующее средство (средства), описаны в патентном документе International PCT Patent Application WO 01/07067 A2. Подходящие методы и композиции для таргетной системной доставки хондропротекторных композиций, включающих MASP-2 ингибирующее средство (средства), описаны в патентном документе International PCT Patent Application WO 03/063799 A2.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, страдающему от тромботической микроангиопатии (ТМА) или подверженному риску развития тромботической микроангиопатии (ТМА). В одном варианте осуществления ТМА выбирают из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТР) и атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS). В одном варианте осуществления ТМА представляет собой аHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с аHUS во время острой фазы заболевания. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с аHUS во время фазы ремиссии (то есть у субъекта, который выздоровел или частично восстановился после приступа острой фазы аHUS, такая ремиссия подтверждается, например, повышением количества тромбоцитов и/или снижением концентраций LDH в сыворотке, например, как это описано в публикации Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее). В одном варианте осуществления субъект страдает от ТМА или подвержен

рису развития ТМА, которая представляет собой (i) ТМА на фоне рака; (ii) ТМА на фоне химиотерапии; или (iii) ТМА на фоне трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки или трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток). В одном варианте осуществления субъект страдает от синдрома Апшо-Шульмана (USS) или подвержен риску развития синдрома Апшо-Шульмана (USS). В одном варианте осуществления субъект страдает от болезни Дегоса или подвержен риску развития болезни Дегоса. В одном варианте осуществления субъект страдает от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS) или подвержен риску развития катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS). При терапевтическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, страдающему от ТМА или подверженному риску развития ТМА в терапевтически эффективном количестве, достаточном для ингибирования тромбообразования, облегчения или, по меньшей мере, частичного облегчения симптомов состояния.

Как при профилактических, так и при терапевтических схемах лечения, композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут быть введены несколькими дозами до тех пор, пока не будет достигнут соответствующий терапевтический результат у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, которое может быть введено соответствующим способом взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, удобнее, от 1,0 мг до 5000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 2000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 1000 мг и еще удобнее, от 50,0 мг до 500 мг. В случае педиатрических пациентов, доза может быть скорректирована пропорционально массе тела пациента. Применение MASP-2 ингибирующих композиций по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции или ограниченного количества последовательных введений для лечения ТМА. В качестве варианта, композиция может быть введена в определенные периоды времени, раз в сутки, два раза в неделю, один раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц два раза в месяц в течение продолжительного периода времени для лечения ТМА.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от ТМА или подверженный риску развития ТМА, ранее подвергался или подвергается в настоящий момент лечению с помощью ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, включающую ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, подверженному aHUS или же подверженному риску развития aHUS, в количестве, достаточном для исключения или снижения риска развития симптомов состояния. При терапевтическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, по поводу которого есть подозрения в наличии у него aHUS или который уже страдает от aHUS, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или, по меньшей мере, частичного облегчения симптомов состояния. В одном аспекте изобретения перед введением, субъект может быть подвергнут обследованию для определения наличия у него проявления одного или более симптомов aHUS, включающих (i) анемию, (ii) тромбоцитопению (iii) почечную недостаточность и (iv) повышение креатинина, и затем вводят композицию по настоящему изобретению в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для облегчения этих симптомов.

В другом аспекте изобретения, MASP-2 ингибирующие композиции по настоящему изобретению могут применяться для профилактического лечения субъекта с повышенным риском развития aHUS и, вследствие этого, для снижения вероятности того, что у субъекта может возникнуть aHUS. Сначала определяют присутствие у субъекта генетического маркера, по поводу которого известно, что он ассоциируется с aHUS, путем проведения генетического скрининг-теста на образце, взятом у пациента, и идентификации присутствия по меньшей мере одного генетического маркера, ассоциируемого с aHUS, фактора комплемента Н (CFH), фактора I (CFI), фактора В (CFB), мембранного кофакторного белка CD46, C3, белка, сходного с комплементом фактора Н (CFHR1), антикоагулянтного белка тромбодулина (THBD), белка 3, сходного с комплементом фактора Н (CFHR3) или белок 4, сходного с комплементом фактора Н (CFHR4). Затем субъекта периодически подвергают мониторингу (например, один раз в месяц, один раз в три месяца, два раза в год или один раз в год) для определения присутствия или отсутствия по меньшей мере одного симптома aHUS, такого как анемия, тромбоцитопения, почечная недостаточность и повышение креатинина. После определения присутствия по меньшей мере одного из этих симптомов, субъекту может быть введено количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента, в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для улучшения одного или более указанных симптомов. В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект с повышенным риском развития aHUS, обусловленным тем, что у него в процессе проведения скрининга было обнаружено наличие одного из генетических маркеров, ассоциированных с aHUS, может быть подвергнут мониторингу на возникновение события, связанного с

инициированием клинических симптомов aHUS, включающего продолжительное воздействие лекарственного средства, инфекцию (например, бактериальную инфекцию), злокачественное новообразование, повреждение, трансплантацию органа или ткани, и беременность.

В еще одном аспекте настоящего изобретения композиция, включающая количество MASP-2 ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента, может быть введена субъекту, страдающему от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) или подверженному риску развития атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) на фоне инфекции. Например, пациент, страдающий от некишечного aHUS или подверженный риску развития некишечного aHUS, связанного с пневмококковой инфекцией, может быть подвергнут лечению с помощью композиций по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от aHUS, может быть сначала подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, которую вводят через линию катетера, такую как линия внутривенного катетера или линия подкожного катетера, в течение первого периода времени, например, в течение 1, 12 ч, 1 дня, 2 или 3-х дней. Затем субъект может быть подвергнут лечению в течение второго периода времени с помощью MASP-2 ингибирующей композиции, вводимой путем регулярных подкожных инъекций, например, инъекций один раз в сутки, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц.

В еще одном аспекте настоящего изобретения MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от aHUS, без применения метода плазмафереза (то есть субъекту, у которого симптомы aHUS не подвергали лечению с помощью плазмафереза и не подвергают лечению с помощью плазмафереза в период лечения с помощью MASP-2 ингибирующей композиции), с целью предотвращения потенциальных осложнений, возникающих при плазмаферезе, включая геморрагию, инфекцию и подверженность нарушениям и/или аллергии, имеющимся у донора плазмы, или же субъекту, который отвергает использование плазмафереза, или в условиях, когда использование плазмафереза недоступно.

В еще одном аспекте настоящего изобретения MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от aHUS, одновременно с лечением пациента методом плазмафереза. Например, субъекту, подвергаемому лечению плазмаферезом, может затем введена MASP-2 ингибирующая композиция после замещения плазмы или при чередовании с замещением плазмы.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от aHUS или подверженный риску развития aHUS и подвергающийся в данный момент лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, может быть подвергнут мониторингу путем периодического определения, например, каждые 12 ч или один раз в сутки, уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где определение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением со здоровым субъектом указывает на необходимость продолжения лечения с помощью композиции.

Как в случае профилактической, так и в случае терапевтической схемы лечения, композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут вводиться несколькими дозами до тех пор, пока не будет достигнут соответствующий терапевтический результат у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, которое может быть соответствующим способом введено взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, удобнее, от 1,0 мг до 5000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 2000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 1000 мг, и еще удобнее, от 50,0 мг до 500 мг. В случае педиатрических пациентов, доза может быть скорректирована пропорционально массе тела пациента. Применение MASP-2 ингибирующих композиций по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции или путем ограниченного числа последовательных введений для лечения aHUS. В качестве варианта, композиция может быть введена в определенные периоды времени, например, один раз в день, один раз в две недели, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц, в течение продолжительного периода времени для лечения aHUS.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от aHUS, был ранее подвергнут или подвергается в данный момент лечению с помощью ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, включающей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепления белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, подверженному HUS или же подверженному риску возникновения HUS, в количестве, достаточном для исключения или сни-

жения риска развития симптомов состояния. При терапевтическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, по поводу которого существует подозрение о наличии у него HUS или который уже страдает от HUS, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или, по меньшей мере, частичном облегчении, симптомов состояния.

В другом аспекте по настоящему изобретению, может быть уменьшена вероятность развития нарушения функции почек у субъекта, подверженного риску развития HUS, путем введения субъекту MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. Например, субъект, подверженный риску развития HUS и подвергаемый лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, может проявлять один или более симптомов, связанных с HUS, включая диарею, уровень гематокрита ниже 30% с обнаружением в мазке внутрисосудистой деструкции эритроцитов, тромбоцитопению и повышение уровней креатинина. В качестве дополнительного примера, субъект, подверженный риску развития HUS и подвергаемый лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, может быть инфицирован кишечной палочкой, шигеллой или сальмонеллой. Такие субъекты, инфицированные кишечной палочкой, шигеллой или сальмонеллой, могут быть подвергнуты лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению одновременно с лечением антибиотиком, или, в качестве варианта, могут быть подвергнуты лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции без одновременного лечения с помощью антибиотика, в частности, в случае энтерогенной кишечной палочки, для которой лечение антибиотиком противопоказано. Субъект, инфицированный энтерогенной кишечной палочкой, который был подвергнут лечению антибиотиком, может быть подвержен повышенному риску развитию HUS, и может быть соответствующим образом подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению для снижения степени риска. Субъект, инфицированный энтерогенной кишечной палочкой, может быть подвергнут лечению в течение первого периода времени с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению в отсутствие антибиотика и затем, в течение второго периода времени, быть подвергнут лечению как с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, так и с помощью антибиотика.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от HUS, может быть сначала подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, которую вводят через линию катетера, например, линию внутривенного катетера или линию подкожного катетера, в течение первого периода времени, например, в течение 1, 12 ч, 1, 2 или 3-х дней. Затем субъект может быть подвергнут лечению в течение второго периода времени с помощью MASP-2 ингибирующей композиции, вводимой путем регулярных подкожных инъекций, например, инъекций один раз в день, один раз в две недели, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц.

В еще одном аспекте настоящего изобретения MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от HUS, без применения метода плазмафереза (то есть субъекту, у которого симптомы HUS не подвергали лечению с помощью плазмафереза и которого не подвергают лечению с помощью плазмафереза в период лечения с помощью MASP-2 ингибирующей композиции), для предотвращения возникновения потенциальных осложнений при плазмаферезе, включающих геморрагию, инфекцию и подверженность воздействию нарушений и/или аллергии, присутствующих у донора плазмы, или же когда у субъекта имеются противопоказания к использованию плазмафереза, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В еще одном аспекте настоящего изобретения MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от HUS, одновременно с лечением пациента методом плазмафереза. Например, субъекту, подвергаемому лечению плазмаферезом, затем может быть введена MASP-2 ингибирующая композиция после замещения плазмы или с чередованием с замещением плазмы.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от HUS или подверженный риску развития HUS, и подвергаемый лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, может быть подвергнут мониторингу путем периодического определения, например, каждые 12 ч или один раз в день, уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где определение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или со здоровым субъектом указывает на необходимость продолжения лечения с помощью композиции.

Как в случае профилактической, так и в случае терапевтической схемы лечения, композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут вводиться несколькими дозами до тех пор, пока не будет достигнут соответствующий терапевтический результат у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, которое может быть соответствующим способом введено взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, удобнее, от 1,0 мг до 5000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 2000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 1000 мг, и еще удобнее, от 50,0 мг до 500 мг. В случае педиатрических пациен-

тов, доза может быть скорректирована пропорционально массе тела пациента. Применение MASP-2 ингибирующих композиций по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции или путем ограниченного числа последовательных введений для лечения HUS. В качестве варианта, композиция может быть введена в определенные периоды времени, например, один раз в день, один раз в две недели, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц, в течение продолжительного периода времени для лечения HUS.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от HUS, был ранее подвергнут или подвергается в данный момент лечению с помощью ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, включающей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепления белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, подверженному ТТР или же подверженному риску возникновения ТТР, в количестве, достаточном для исключения или снижения риска развития симптомов состояния. При терапевтическом применении, фармацевтические композиции вводят субъекту, по поводу которого существует подозрение о наличии у него ТТР или который уже страдает от ТТР, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или, по меньшей мере, частичном облегчении, симптомов состояния.

В другом аспекте по настоящему изобретению, субъект, проявляющий один или более симптомов ТТР, включающих вовлечение в патологический процесс центральной нервной системы, тромбоцитопению, тяжелое поражение сердца, тяжелое поражение легких, инфаркт желудочно-кишечного тракта и гангрену, может быть подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению. В другом аспекте по настоящему изобретению, субъект, у которого обнаружено угнетение уровня ADAMTS13, и у которого проведение теста на присутствие ингибитора (то есть антитела) ADAMTS13 также дало положительный результат, может быть подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению. В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, у которого проведение теста на присутствие ингибитора ADAMTS13 дало положительный результат, может быть подвергнут лечению с помощью иммунодепрессанта (например, с помощью кортикостероидов, ритуксана или циклоспорина) одновременно с лечением MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению. В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, у которого обнаружено снижение уровня ADAMTS13 и у которого проведение теста на присутствие ингибитора ADAMTS13 дало положительный результат, может быть подвергнут лечению с помощью ADAMTS13 одновременно с лечением с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от ТТР, может быть сначала подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, которую вводят через линию катетера, например, линию внутривенного катетера или линию подкожного катетера, в течение первого периода времени, например, в течение 1, 12 ч, 1, 2 или 3-х дней. Затем субъект может быть подвергнут лечению в течение второго периода времени с помощью MASP-2 ингибирующей композиции, вводимой путем регулярных подкожных инъекций, например, инъекций один раз в день, один раз в две недели, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц.

MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от ТТР, без применения метода плазмафереза (то есть субъекту, у которого симптомы ТТР не подвергали лечению с помощью плазмафереза и которого не подвергают лечению с помощью плазмафереза в период лечения с помощью MASP-2 ингибирующей композиции), для предотвращения возникновения потенциальных осложнений при плазмаферезе, включающих геморрагию, инфекцию и подверженность воздействию нарушений и/или аллергии, присущих донору плазмы, или же когда у субъекта имеются противопоказания к использованию плазмафереза, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В еще одном аспекте настоящего изобретения MASP-2 ингибирующая композиция по настоящему изобретению может быть введена субъекту, страдающему от ТТР, одновременно с лечением пациента методом плазмафереза. Например, субъекту, подвергаемому лечению плазмаферезом, затем может быть введена MASP-2 ингибирующая композиция после замещения плазмы или с чередованием с замещением плазмы.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от рефракторной ТТР, то есть от симптомов ТТР, которые не отвечают адекватно на другое лечение, такое как плазмаферез, может быть подвергнут лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению с применением или без применения дополнительного плазмафереза.

В еще одном аспекте настоящего изобретения субъект, страдающий от ТТР или подверженный рис-

ку развития ТТР, и подвергаемый лечению с помощью MASP-2 ингибирующей композиции по настоящему изобретению, может быть подвергнут мониторингу путем периодического определения, например, каждые 12 ч или один раз в день, уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, где определение пониженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента по сравнению со стандартным значением или со здоровым субъектом указывает на необходимость продолжения лечения с помощью композиции.

Как в случае профилактической, так и в случае терапевтической схемы лечения, композиции, включающие MASP-2 ингибирующие средства, могут вводиться несколькими дозами до тех пор, пока не будет достигнут соответствующий терапевтический результат у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-2 ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, которое может быть соответствующим способом введено взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, удобнее, от 1,0 мг до 5000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 2000 мг, удобнее, от 10,0 мг до 1000 мг, и еще удобнее, от 50,0 мг до 500 мг. В случае педиатрических пациентов, доза может быть скорректирована пропорционально массе тела пациента. Применение MASP-2 ингибирующих композиций по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения композиции или путем ограниченного числа последовательных введений для лечения ТТР. В качестве варианта, композиция может быть введена в определенные периоды времени, например, один раз в день, один раз в две недели, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или два раза в месяц, в течение продолжительного периода времени для лечения ТТР.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от ТТР, был ранее подвергнут или подвергается в данный момент лечению с помощью ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, включающей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминальных компонентов комплемента, который ингибирует расщепления белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления the ингибитор терминальных компонентов комплемента is a гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой гуманизированное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминальных компонентов комплемента представляет собой экулизумаб.

VI. Примеры.

Следующие далее примеры только иллюстрируют предлагаемый на данный момент наилучший способ применения изобретения на практике, но их никоим образом не следует рассматривать в качестве ограничений для изобретения. Содержание всех цитируемых литературных источников приводится в изобретении путем ссылок на эти источники.

Пример 1.

В этом примере описывается генерация штамма MASP-2 дефицитных мышей (MASP-2^{-/-}), но достаточных по MASP19 (MASP19^{+/+}).

Материалы и методы. Конструировали таргетирующий вектор pKO NTKV 1901 для разрушения трех экзонов, кодирующих C-терминальный конец мышинной MASP-2, в том числе экзон, который кодирует домен серин-протеазы, показанный на фиг. 3. PKO NTKV 1901 использовали для трансфекции мышинных эмбриональных стволовых (ES) клеток линии E14.1a (SV129 Ola). Выбирали клоны, устойчивые к неомицину и чувствительные к тимидинкиназе. Подвергали 600 клонов ES скринингу, и из них идентифицировали и верифицировали четыре различных клон методом саузерн-блоттинга, содержащих желаемое селективное таргетирование и явление рекомбинации, как показано на фиг. 3. Из этих четырех положительных клонов генерировали химеры методом трансплантации эмбриона. Затем химеры подвергали возвратному скрещиванию в генетическом окружении C57/BL6 с созданием трансгенных самцов. Затем трансгенных самцов скрещивали с самками для генерации F1s с 50% потомства, проявляющего гетерозиготность по разрушенному гену MASP-2. Гетерозиготных мышей подвергали взаимному скрещиванию с генерированием гомозиготного MASP-2 дефицитного потомства, получая в результате гетерозиготных и немутантных мышей, при соотношении 1:2:1 соответственно.

Результаты и фенотип. Было обнаружено, что полученные гомозиготные MASP-2^{-/-} дефицитные мыши являются жизнеспособными и фертильными, и их подвергали проверке на MASP-2 дефицитность методом саузерн-блоттинга для подтверждения корректного таргетирующего события, методом нозерн-блоттинга для подтверждения отсутствия мРНК MASP-2, и методом вестерн-блоттинга для подтверждения отсутствия белка MASP-2 (данные не показаны). Затем подтверждали присутствие мРНК MASP19 и отсутствие мРНК MASP-2 методом полимеразной цепной реакция с обратной транскрипцией (RT PCR) в масштабе реального времени, используя прибор LightCycler. Как и ожидалось, MASP-2^{-/-} мыши действительно продолжали экспрессировать MASP19, MASP 1 и мРНК и белок MASP-3 (данные не показаны). Оценивали присутствие и избыток у MASP-2^{-/-} мышей мРНК для пропердина, фактора В, фактора D, C4, C2, и C3 методом анализа LightCycler, и было обнаружено, что эти данные идентичны с теми, которые получают в случае контрольных однопотомных немутантных мышей (данные не показаны). Плазма го-

мозиготных MASP-2^{-/-} мышей характеризуется полным дефицитом активации комплемента, опосредованной лектиновым путем, как это описано далее в примере 2.

Генерация MASP-2^{-/-} штамма в чистом генетическом окружении C57/BL6. MASP-2^{-/-} мыши подвергали обратному скрещиванию с чистой линией C57BL6 в течение девяти поколений, перед тем как использовать MASP-2^{-/-} штамм в качестве экспериментальной модели на животном.

Штамм трансгенных мышей, который представляет собой мышиную MASP-2^{-/-}, MAr19^{+/+} и который экспрессирует трансген человеческой MASP-2 (мышиную MASP-2 нокаутной и человеческой MASP-2 нокинной) также генерировали следующим образом.

Материалы и методы.

Конструировали миниген, кодирующий человеческую MASP-2, называемый "мини hMASP-2" (SEQ ID NO: 49), показанный на фиг. 4, который включает промоторную область гена человеческой MASP-2, в том числе первых 3 экзона (экзон 1 -экзон 3), за которой следует кДНК последовательность, которая представляет кодирующую последовательность следующих 8 экзонов, вследствие чего кодируется полноразмерный белок MASP-2 под воздействием его эндогенного промотора. Конструкцию мини hMASP-2 инъецировали в оплодотворенные яйцеклетки MASP-2^{-/-} мышей, для того чтобы заменить дефицитный ген мышиную MASP-2 на трансгенно экспрессированную человеческую MASP-2.

Пример 2.

В этом примере продемонстрировано, что для активации комплемента по лектиновому пути требуется MASP-2.

Методы и материалы.

Исследование специфического расщепления C4 при лектиновом пути активации комплемента. Исследование расщепления C4 было описано в публикации Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001), в котором измеряли активацию лектинового пути, обусловленную липотейхоевой кислотой (LTA) из золотистого стафилококка, которая связывает L-фиколин. Исследование, описанное в публикации Petersen et al., (2001), адаптировали для измерения активации лектинового пути с помощью MBL путем нанесения покрытия на планшет из LPS и маннана или зимозана перед добавлением сыворотки from MASP-2^{-/-} мышей, как описано ниже. Исследование было также модифицировано с целью исключения возможности расщепления C4 по классическому пути. Это достигалось путем использования буфера для разбавления образца, содержащего 1 M NaCl, который позволяет высокоаффинное связывание компонентов распознавания лектинового пути с их лигандами, но предотвращает активацию эндогенного C4, тем самым исключая участие классического пути в результате диссоциации комплекса C1. Описывая вкратце, в модифицированном исследовании, образцы сыворотки (разбавленные в буфере с высоким содержанием соли (1 M NaCl)) добавляют в планшеты с нанесенным слоем лиганда, затем добавляют постоянное количество очищенного C4 в буфере с физиологической концентрацией соли. Связанные комплексы распознавания, содержащие MASP-2, расщепляют C4, что приводит к отложению C4b.

Методы исследования.

1) В титрационные микропланшеты Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, № по каталогу 442404, Fisher Scientific) наносили слой 1 мкг/мл маннана (M7504 Sigma) или любого другого лиганда (например, такого как лиганды, перечисленные ниже), разбавленного в покрывающем буфере (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6).

В исследовании были использованы следующие реагенты:

- маннан (1 мкг на лунку маннана (M7 504 Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);
- зимозан (1 мкг на лунку зимозана (Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);
- липотейхоевая кислота (LTA) (1 мкг на лунку в 100 мкл покрывающего буфера или 2 мкг на лунку в 20 мкл метанола);
- 1 мкг Н-фиколин специфичного Mab 4H5 в покрывающем буфере;
- PSA из аэрококков вида *Aerococcus viridans* (2 мкг на лунку в 100 мкл покрывающего буфера);
- 100 мкл на лунку зафиксированного в формалине золотистого стафилококка DSM20233 (OD₅₅₀=0,5) в покрывающем буфере;

2) Планшеты подвергли инкубации в течение ночи при 4°C.

3) После инкубации в течение ночи, насыщали остаточные участки связывания белков путем инкубации планшетов с 0,1% HSA-TBS блокирующим буфером (0,1% (масса на единицу объема) HSA в 10 mM Tris CL, 140 mM NaCl, 1,5 mM NaN₃, pH 7,4) в течение 1-3 ч, промывая затем планшеты 3 раза с помощью TBS/tween/Ca²⁺ (TBS с 0,05% Tween 20 и 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4).

4) Подвергаемые тестированию образцы сыворотки разбавляли в MBL связывающем буфере (1 M NaCl), и разбавленные образцы добавляли в планшеты и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки, в которые добавляли только буфер, использовали в качестве негативного контроля.

5) После инкубации в течение ночи при 4°C, планшеты три раза промывали с помощью TBS/tween/Ca²⁺. Затем в планшеты добавляли человеческий C4 (100 мкл/лунка 1 мкг/мл, разбавленного в BBS (4 mM барбитал, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4)) и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Планшеты снова промывали 3 раза с помощью TBS/tween/Ca²⁺.

6) Отложение C4b обнаруживали с помощью конъюгированного со щелочной фосфатазой куриного

антитела против человеческого с4с (разбавленного 1:1000 в TBS/tween/Ca²⁺), которое добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре. Затем планшеты снова три раза промыли с помощью TBS/tween/Ca²⁺.

7) Щелочную фосфатазу определяли путем добавления 100 мкл субстратного раствора п-нитрофенилфосфата, инкубируя при комнатной температуре в течение 20 минут и считывая OD405 на спектрофотометре для прочтения титрационных микропланшетов.

Результаты. На фиг. 5А-В показано количество отложения С4b на маннанае (фиг. 5А) и зимозане (фиг. 5В) в разбавлениях сыворотки крови MASP-2+/+ (крестики), MASP-2+/- (затушеванные кружки) и MASP-2-/- (затушеванные треугольники) мышей. На фиг. 5С показана относительная активность С4-конвертазы на планшетах с нанесенным слоем зимозана (белые столбики) или маннана (заштрихованные столбики) MASP-2+/+ мышей (n=5) и MASP-2-/- мышей (n=4) относительно немутантных мышей (n=5), полученная путем измерения количества отложения С4b, нормализованного к сыворотке мышей немутантного типа. Столбики погрешностей представляют стандартное отклонение. Как показано на фиг. 5А-С, плазма MASP-2-/- мышей является абсолютно дефицитной по активации комплемента, опосредованной лектиновым путем, на планшетах с нанесенным слоем маннана зимозана. Эти результаты однозначно показывают, что MASP-2 является эффекторным компонентом лектинового пути.

Рекомбинантное MASP-2 восстанавливает зависимость от лектинового пути активацию С4 в сыворотке крови MASP-2-/- мышей.

Для того чтобы установить, что отсутствие MASP-2 являлось непосредственной причиной снижения зависимости от лектинового пути активация С4 у MASP-2-/- мышей, изучали эффект добавления рекомбинантного белка MASP-2 в образцы сыворотки в описанном выше исследовании расщепления С4. Продуцировали и очищали функционально активные рекомбинантные белки мышшиной MASP-2 и каталитически неактивной мышшиной MASP-2А (в котором активный сайт остатка серина в домене серин-протеазы был замещен остатком аланина), как описано в примере 3. Смешанную сыворотку четырех MASP-2-/- мышей инкубировали с возрастающими концентрациями рекомбинантного белка мышшиной MASP-2 или неактивной мышшиной MASP-2А, и определяли активность С4-конвертазы, как описано выше.

Результаты. Как показано на фиг. 6, добавление функционально активного рекомбинантного белка мышшиной MASP-2 (показано незатушеванными треугольниками) к сыворотке MASP-2-/- мышей восстанавливало зависимость от лектинового пути активацию С4 в зависимости от концентрации белка, в то время как белок каталитически неактивной мышшиной MASP-2А (показано звездочками) не восстанавливал активацию С4. Результаты, показанные на фиг. 6, нормализованы к активации С4, наблюдаемой в смешанной сыворотке немутантных мышей (показано пунктирной линией).

Пример 3.

В этом примере описывается рекомбинантная экспрессия и продуцирование белка рекомбинантной полноразмерной человеческой, крысиной и мышшиной MASP-2, полипептидов, полученных из MASP-2, и каталитически инактивированных мутантных форм MASP-2.

Экспрессия полноразмерной человеческой, крысиной и мышшиной MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 4) также субклонировали в экспрессирующий вектор pCI-Neo млекопитающих (Promega), который управляет эукариотической экспрессией под контролем CMV энхансерной/промоторной области (как описано в публикациях Kaufman RJ. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:531-66 (1991)). Полноразмерную мышшиную кДНК (SEQ ID NO: 50) и крысиную кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 53) каждую субклонировали в экспрессирующий вектор pED. Экспрессирующие вектора MASP-2 затем трансфицировали в линию адгезивных клеток DXB1 яичников китайского хомячка, используя стандартный метод трансфекции с фосфатом кальция, описанный в публикации Maniatis et al., 1989. Клетки, трансфицированные с помощью таких конструкций, росли очень медленно, что объясняется цитотоксичностью кодируемой протеазы.

При другом подходе, конструкция минигена (SEQ ID NO: 49), содержащую человеческую кДНК MASP-2, управляемую ее эндогенным промотором, транзигентно трансфицируют в клетки яичников китайского хомячка (CHO). Белок человеческой MASP-2 секретируют в культуральной среде и выделяют, как описано ниже.

Экспрессия полноразмерной каталитически неактивной MASP-2.

Актуальность. MASP-2 активируется путем аутокаталитического расщепления после того, как субкомпоненты распознавания MBL или фиколины (либо L-фиколин, Н-фиколин, либо М-фиколин) связываются с их соответствующим углеводным паттерном. Аутокаталитическое расщепление, вызванное активацией MASP-2, часто происходит во время процедуры выделения MASP-2 из сыворотки или во время очистки после рекомбинантной экспрессии. Для того чтобы получить более стабильный препарат белка, используемого в качестве антигена, создавали каталитически неактивную форму MASP-2, конструктивно выполненную в виде MASP-2А, путем замещения остатка серина, который присутствует в каталитической триаде домена протеазы, на остаток аланина у крыс (SEQ ID NO: 55 Ser617 на Ala617), у мышей (SEQ ID NO: 52 Ser617 на Ala617) или у человека (SEQ ID NO: 3 Ser618 на Ala618).

Для генерирования каталитически неактивных белков человеческой и мышинной MASP-2A, проводили сайт-направленный мутагенез, используя олигонуклеотиды, представленные в табл. 5. Олигонуклеотиды в табл. 5 были предназначены для соединения с участком человеческой и мышинной кДНК, кодирующей ферментативно активный серин, и олигонуклеотиды содержали нарушение комплементарности, для того чтобы превратить кодон серина в кодон аланина. Например, использовали полимеразную цепную реакцию (PCR) олигонуклеотидов SEQ ID NOS:56-59 в комбинации с кДНК человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 4) для амплификации участка от иницирующего кодона до ферментативно-активного серина и от серина до терминирующего кодона с целью генерирования полного открытого считывания из мутированной MASP-2A, содержащей мутацию Ser618 в Ala618. После электрофореза в агарозном геле, продукты PCR очищали, и генерировали препарат диска хромосом и единичные аденозиновые перекрытия, используя стандартный метод наращивания. Затем полученную с аденозином на конце MASP-2A клонировали в простой вектор pGEM-T, трансформированный в кишечную палочку.

Генерировали белок каталитически неактивной крысиной MASP-2A путем киназирования и ренатурирования SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 65, проводя объединение этих двух олигонуклеотидов в равных молярных количествах, нагревание при температуре 100°C в течение 2 минут и медленное охлаждение до комнатной температуры. Полученный в результате ренатурирования фрагмент содержал совместимые с PstI и XbaI концы, и его вставляли вместо PstI-XbaI фрагмента кДНК MASP-2 немутантной крысы (SEQ ID NO: 53) с получением крысиной MASP-2A.

5' GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTC 3' (SEQ ID NO: 64).

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO: 65).

Человеческую, мышиную и крысиную MASP-2A далее каждую субклонировали в экспрессирующие векторы млекопитающих pED или pCI-Neo и трансфицировали в линии клеток DXBI яичников китайских хомячков, как описано ниже.

При другом подходе, сконструирована каталитически неактивная форма MASP-2, используя метод, описанный в публикации Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001. Вкратце, плазмиду, содержащую полноцепочечную человеческую кДНК MASP-2 (описанную в публикации Thiel et al. Nature 386:506, 1997), разрезали рестриктазами XhoI и EcoRI, и кДНК MASP-2 (описанная в изобретении как SEQ ID NO: 4) клонировали в соответствующие сайты рестрикции бакуловирусного трансфертного вектора pFastBad (Life Technologies, NY). Активный сайт MASP-2 серин-протеазы в Ser618 затем заменяли на Ala618 путем замены двухцепочечных олигонуклеотидов, кодирующих область пептида от 610 по 625 аминокислоты (SEQ ID NO: 13), на природный участок от 610 по 625 аминокислоты, с целью создания полноразмерного полипептида MASP-2 с неактивным протеазным доменом.

Конструирование экспрессирующих плазмид, содержащих полипептидные области, образованные из человеческой MASP-2.

Для секретирования различных доменов MASP-2, продуцируют следующие конструкции, используя сигнальный пептид MASP-2 (остатки 1-15 последовательности SEQ ID NO: 5). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBI человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 8), получают методом PCR-амплификации области, кодирующей остатки 1-121 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-терминальному домену CUBI). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGF человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 9), получают методом PCR-амплификации области, кодирующей остатки 1-166 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-терминальному домену CUBIEGF). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGFCUBII человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 10), получают методом PCR-амплификации области, кодирующей остатки 1-293 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-терминальному домену CUBIEGFCUBII). Упомянутые выше домены амплифицируют методом PCR, используя VentR полимеразы и pBS-MASP-2 в качестве темплата, в соответствии с общепринятыми методами PCR. Последовательность праймера 5' смыслового праймера (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO: 34) вводит BamHI сайт рестрикции (подчеркнутый) на конце 5' продукта ПЦР. Антисмысловые праймеры для каждого домена MASP-2, приведенные ниже в табл. 5, сконструированы для введения терминирующего кодона (выделенный полужирным шрифтом), после сайта EcoRI (подчеркнутый) на конце каждого продукта PCR. После амплификации, фрагменты ДНК разрезают рестриктазами BamHI и EcoRI и клонируют в соответствующие сайты вектора pFastBac1. Полученные конструкции характеризуют рестрикционным картированием и подтверждают путем секвенирования dsDNA.

Таблица 5
MASP-2 Праймеры для PCR

Домен MASP-2	5' праймер для PCR	3' праймер для PCR
SEQ ID NO:8 CUBI (aa 1-121 последовательности SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTG CTGACCCCTC3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCA TA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (aa 1-166 последовательности SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTG CTGACCCCTC3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCG CT3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (aa 1- 293 последовательности SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTG CTGACCCCTC3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGG AT3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 человеческая MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGACCCT CCTGGGCCTTC3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_прямой	5'TTAAATCACTAATTAT GTTCTCGATC3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_обратный
SEQ ID NO:4 кДНК человеческой MASP-2	5'CAGAGGTGACGCAGGAG GGGCAC3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ала_прямой	5'GTGCCCTCCTGCGTCA CCTCTG3' (SEQ ID NO: 57) hMASP- 2_ала_обратный
SEQ ID NO:50 кДНК мышиной MASP-2	5'ATGAGGCTACTCATCTT CCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_прямой	5'TTAGAAATTAATTATTA TGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_обратный
SEQ ID NO:50 кДНК мышиной MASP-2	5'CCCCCCTGCGTCACCT CTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ала_прямой	5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG3' (SEQ ID NO: 61) mMASP- 2_ала_обратный

Эукариотическая экспрессия рекомбинантной MASP-2 и получение белков ферментативно неактивной мышиной, крысиной и человеческой MASP-2A.

Описанные выше экспрессирующие конструкции MASP-2 и MASP-2A трансфицировали в DXB1 клетки, используя стандартный метод трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в культуральной среде, не содержащей сыворотку, чтобы исключить загрязнение препаратов другими сывороточными белками. Каждый второй день собирали культуральную среду от конфлюэнтных клеток (суммарно четыре раза). Уровень рекомбинантной MASP-2A составлял в среднем 1,5 мг/литр культуральной среды для каждого из трех видов.

Очистка белка MASP-2A. MASP-2A (описанную выше мутантную форму Ser-Ala) очищали методом аффинной хроматографии на колонках с MBP-A-агарозой. Этот подход позволял проводить быструю очистку без использования инородных маркеров. MASP-2A (100-200 мл культуральной среды, разбавленной равным объемом загрузочного буфера (50 ммоль Tris-Cl, pH 7,5, с содержанием 150 ммоль NaCl и 25 ммоль CaCl₂) загружали в колонку для аффинной хроматографии на MBP-агарозе (4 мл), предварительно приведенную в равновесие с 10 мл загрузочного буфера. После промывки с помощью дополнительных 10 мл загрузочного буфера, белок элюировали во фракции объемом 1 мл с помощью 50 ммоль Tris-Cl, pH 7,5, содержащего 1,25 моль NaCl и 10 ммоль EDTA. Фракции, содержащие MASP-2A, идентифицировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. При необходимости, MASP-2A дополнительно очищали методом ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (HR 5/5). Белок диализовали с помощью 50 ммоль Tris-Cl pH 7,5, содержащего 50 ммоль NaCl, и загружали в колонку, приведенную в равновесие с тем же буфером. После промывки, связанную MASP-2A элюировали с помощью раствора с градиентом 0,05-1 NaCl в 10 мл.

Результаты. Выход белка MASP-2A составлял 0,25-0,5 мг на 200 мл культуральной среды. Молекулярная масса, определяемая методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI MS), составляла величину 77,5 кДа, что больше, чем расчетная величина для немодифицированного полипептида (73,5 кДа), что обусловлено гликозилированием. Наблюдаемое увеличение массы объясняется присоединением гликанов к каждому из сайтов N-гликозилирования. MASP-2A мигрирует в форме одиночной полосы в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, что свидетельствует о том, что в процессе биосинтеза она не подвергается протеолитическому разложению. Средневесовая молекулярная масса, определенная методом равновесного ультрацентрифугирования, согласуется с расчетным значением для гомодимеров гликозилированного полипептида.

Продуцирование полипептидов рекомбинантной человеческой MASP-2.

Другой способ продуцирования полипептидов из рекомбинантных MASP-2 и MASP2A, описан в публикации Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Вкратце, клетки насекомого *Spodoptera frugiperda* (клетки Ready-Plaques Sf9, полученные от фирмы Novagen, Madison, WI) выращивают и

сохраняют в бессывороточной культуральной среде Sf90011 (Life Technologies), дополненной 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Клетки насекомого *Trichoplusia ni* (High Five), предоставленные Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) сохраняют в культуральной среде TC100 (Life Technologies), содержащей 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France), дополненной 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Рекombинантные бакуловирусы генерируют, используя систему Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмидную ДНК очищают, используя систему для мидипрепаративной очистки Qiagen (Qiagen), и применяют для трансфекции клеток насекомых Sf9 при использовании селфектина в культуральной среде Sf900 II SFM (Life Technologies), как описано в протоколе фирмы-производителя. Рекombинантные вирусные частицы собирают через 4 дня, титруют с помощью вирусологического теста на бляшкообразование и амплифицируют, как описано в руководстве King and Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., London, pp.111-114, 1992.

Клетки High Five ($1,75 \times 10^7$ клеток в колбе объемом 175 см² для выращивания тканевых культур) инфицировали рекombинантными вирусами, содержащими полипептиды MASP-2, при множественности заражения 2 в среде Sf900 II SFM при 28°C в течение 96 ч. Надосадочные жидкости центрифугированием и добавляли диизопропил фосфофлуоридат до конечной концентрации 1 ммоль.

Полипептиды MASP-2 секретируют в культуральную среду. Культуральные надосадочные жидкости подвергают диализу против 50 ммоль NaCl, 1 ммоль CaCl₂, 50 ммоль гидрохлорида триэтаноламина, при pH 8,1, и загружают при расходе 1,5 мл/мин в колонку с быстропроточной Q-сефарозой (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), приведенную в равновесие с тем же буфером. Элюирование проводят с помощью 1,2 литра этого же буфера с линейным градиентом до 350 ммоль NaCl. Фракции, содержащие рекombинантные полипептиды MASP-2, идентифицируют методом вестерн-блоттинга, осаждают путем добавления (NH₄)₂SO₄ до 60% (масса к объему), и выдерживают в течение ночи при 4°C. Осадки ресуспендируют в 145 ммоль NaCl, 1 ммоль CaCl₂, 50 ммоль гидрохлорида триэтаноламина, при pH 7,4, и наносят на колонку TSK G3000 SWG (7,5×600 мм) Tosohaas, Montgomeryville, PA), приведенную в равновесие с тем же буфером. Затем очищенные полипептиды концентрируют до 0,3 мг/мл методом ультрафильтрации в микроконцентраторах Microsep (отсекаемая молекулярная масса=10000) (Filtron, Karlstein, Germany).

Пример 4.

В этом примере описывается способ продуцирования поликлональное антитела против полипептидов MASP-2.

Материалы и методы.

Антигены MASP-2. Поликлональную антисыворотку против человеческой MASP-2 продуцируют путем иммунизации кроликов с помощью следующих выделенных полипептидов MASP-2: выделенная из сыворотки человеческая MASP-2 (SEQ ID NO: 6), рекombинантная человеческая MASP-2 (SEQ ID NO: 6), MASP-2A, содержащая домен неактивной протеазы (SEQ ID NO: 13), описанная в примере 3, и рекombинантные CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) и CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10), экспрессированные, как описано выше в примере 3.

Поликлональные антитела. Кроликов в возрасте шести недель, получивших первичную вакцинацию с помощью бациллы Кальметта-Герена (BCG), иммунизируют путем инъекции 100 мкг полипептида MASP-2 в 100 мкг/мл стерильного физиологического раствора. Инъекции осуществляют каждые 4 недели с мониторингом титра антител методом ELISA (методом твердофазного иммуноферментного анализа), как описано в примере 7. Собирают культуральные надосадочные жидкости для очистки антител методом аффинной хроматографии на основе связывания с белком А.

Пример 5.

В этом примере описывается способ продуцирования мышинных моноклональных антител против полипептидов крысиной или человеческой MASP-2.

Материалы и методы.

Самцам мышей линии A/J Harlan, Houston, Tex.) в возрасте 8-12 недель подкожно инъецируют 100 мкг полипептидов человеческих или крысиных гMASP-2 или гMASP-2A (полученных, как описано в примере 3) в полном адьюванте Фрейнда Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) с pH 7,4. С двухнедельными интервалами мышам дважды подкожно инъецируют 50 мкг полипептида человеческой или крысиной гMASP-2 или гMASP-2A в неполном адьюванте Фрейнда. На четвертой неделе, мышам инъецируют 50 мкг полипептида человеческой или крысиной гMASP-2 или гMASP-2A в PBS и через 4 дня мышей объединяют.

Для каждого случая объединения, приготавливают суспензии отдельных клеток из селезенки иммунизированной мыши и используют для объединения с клетками миеломы Sp2/0. 5×10^8 клеток Sp2/0 и 5×10^8 клеток селезенки объединяют в среде, содержащей 50% полиэтиленгликоля (молекулярная масса 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) и 5% диметилсульфоксида (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Затем концентрацию клеток корректируют до $1,5 \times 10^5$ клеток селезенки в 200 мкл суспензии в среде Исков (Gibco, Grand Island, N.Y.), дополненной 10% фетальной сывороткой, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл

стрептомицина, 0,1 ммоль гипоксантина, 0,4 мкмоль аминоптерина и 16 мкмоль тимидина. Двести микролитров клеточной суспензии добавляют в каждую лунку из приблизительно двадцати лунок 96-луночных планшетов для микрокультур. Приблизительно через десять дней, отбирают надосадочные культуральные жидкости для скрининга на предмет их реакционной способности к взаимодействию с очищенным фактором MASP-2 методом анализа ELISA.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). В лунки планшетов для микроанализа Immunol 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) наносят покрытие путем добавления 50 мкл очищенной hMASP-2 с концентрацией 50 нг/мл или крысиной gMASP-2 (или gMASP-2A) в течение ночи при комнатной температуре. Низкая концентрация MASP-2 для нанесения покрытия позволяет отбирать высокоаффинные антитела. После нанесения покрытия, удаляют раствор путем встряхивания планшета, и добавляют в каждую лунку в течение 1 ч 200 мкл препарата BLOTTO (обезжиренное сухое молоко) в PBS для блокирования неспецифических сайтов. Через час, лунки промывают буфером PBST (PBS с содержанием 0,05% Tween 20). Отбирают пятьдесят микролитров культуральных надосадочных жидкостей из каждой лунки объединения и смешивают с 50 мкл препарата BLOTTO и затем добавляют в индивидуальные лунки планшетов для микроанализа. После 1 ч инкубации лунки промывают с помощью PBST. Затем определяют связанные мышиные антитела путем проведения реакции с пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной козьим антимышиным IgG (Fc специфичным) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) и разбавляют в соотношении 1:2000 в BLOTTO. Добавляют в лунки субстратный раствор пероксидазы, содержащий 0,1% 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, St. Louis, Mo.) и 0,0003% перекиси водорода (Sigma) лунки для проявления окрашивания в течение 30 минут. Реакцию прерывают путем добавления в каждую лунку 50 мкл 2М раствора H₂SO₄. Считывают оптическую плотность реакционной смеси при 450 нм на планшет-ридере BioTek ELISA Reader (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Анализ связывания MASP-2.

Культуральные надосадочные жидкости, которые дали положительный результат при исследовании MASP-2 описанным выше методом анализа ELISA, могут быть исследованы методом анализа связывания для определения аффинности связывания MASP-2 ингибирующих средств, которой они обладают в отношении MASP-2. Аналогичный анализ может быть также использован для определения того, могут ли ингибирующие средства связываться с другими антигенами в системе комплемента.

На лунки полистирольного микропланшета (96-луночные планшеты среднего связывания, Corning Costar, Cambridge, MA) наносят слой MASP-2 (20 нг/100 мкл/на лунку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) с pH 7,4 в течение ночи при 4°C. После удаления раствора MASP-2, лунки блокируют с помощью PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma Chemical) в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки без нанесенного покрытия MASP-2 используются в качестве контроля. В лунки добавляют аликвоты надосадочных жидкостей гибридомы или очищенных MoAb против MASP-2 с варьирующими концентрациями в блокирующем растворе. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре, лунки тщательно промывают с помощью PBS. MASP-2-связанное MoAb против MASP-2 обнаруживают путем добавления конъюгированного с пероксидазой козьего антимышиного IgG (Sigma Chemical) в блокирующем растворе и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова тщательно промывают с помощью PBS и добавляют 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцию TMB прерывают путем добавления 100 мкл 1М раствора фосфорной кислоты, и планшет считывают при длине волны 450 нм с помощью планшет-ридера SPECTRA MAX 250 (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Культуральные надосадочные жидкости из положительных лунок затем испытывают на их способность ингибировать активацию комплемента в функциональном исследовании, таком как анализ расщепления C4, описанном в примере 2. Затем клетки из положительных лунок клонируют методом предельного разведения. Моноклональные антитела MoAb снова тестируют на их реакционную способность при взаимодействии с hMASP-2 описанным выше методом ELISA. Отобранные гибридомы выращивают во вращающихся колбах, и отработанную культуральную надосадочную жидкость собирают для очищения антител методом аффинной хроматографии на основе связывания с белком А.

Пример 6.

В этом примере описывается генерация и продуцирование гуманизированных мышиных антител против MASP-2 и фрагментов антител.

Мышиное моноклональное антитело против MASP-2 генерируют у самцов мышей линии A/J, как описано в примере 5. Затем мышиное антитело гуманизируют, как описано ниже, для снижения его иммуногенности путем замены мышиных константных областей на их человеческие аналоги для генерации химерного IgG и фрагмента Fab антитела, которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением у людей для ингибирования негативных последствий MASP-2 зависимой активации комплемента.

1. Клонирование генов вариабельных областей против MASP-2 из клеток мышиной гибридомы. Тотальную РНК выделяют из клеток гибридомы, секретирующих MoAb против MASP-2 (полученных, как описано в примере 7), используя RNazol в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Biotech,

Houston, Tex.). Первую цепь кДНК синтезируют из тотальной РНК, используя в качестве праймера синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид (oligo-dT). PCR проводили с использованием 3' праймеров, полученных из константной С-области иммуноглобулина, и наборов вырожденных праймеров, полученных из лидерного пептида или первой каркасной области мышиных генов VH или VK в качестве 5' праймеров. Якорную PCR проводят, как описано в публикации Chen, P.F, Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992. Для клонирования гена VK, получают двухцепочечную кДНК с использованием праймера Not1-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38).

Ренатурированные адаптеры AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) и AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) связывают с лигандами на обоих 5' и 3' концах двухцепочечной кДНК. Адаптеры на 3' концах удаляют посредством расщепления Not1. Затем продукт расщепления используют в качестве матрицы в PCR с олигонуклеотидом AD1 в качестве 5' праймера и MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41) в качестве 3' праймера. Фрагменты ДНК, с приблизительно 500 парами оснований, клонируют в вектор pUC19. Выбирают несколько клонов для анализа последовательности с целью подтверждения того, что клонированная последовательность охватывает ожидаемую константную область мышиного иммуноглобулина. Олигонуклеотиды Not1-MAK1 и MAK2, получают из области VK, и они находятся на 182 и 84 паре оснований, соответственно, после первой пары оснований гена С каппа. Выбирают клоны, которые включают законченную VK и лидерный пептид.

Для клонирования гена VH, получали двухцепочечную кДНК, используя праймер Not1 MAG1 (5'-CGCGGCCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Ренатурированные адаптеры AD1 и AD2 связывают с лигандами на обоих 5' и 3' концах двухцепочечной кДНК. Адаптеры на 3' концах удаляются путем расщепления Not1. Затем продукт расщепления используют в качестве матрицы в PCR с олигонуклеотидом AD1 и MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) в качестве праймеров. Фрагменты ДНК от 500 до 600 пар оснований в длину клонируют в pUC19. Олигонуклеотиды Not1-MAG1 и MAG2 получают из области С γ 7.1 мыши, и они находятся на 180 и 93 паре оснований, соответственно, ниже от первой пары оснований в гене мышиного С γ 7.1. Выбирают клоны, которые включают законченную VH и лидерный пептид.

2. Конструирование экспрессирующих векторов для химерного MASP-2 IgG и Fab. Используют описанные выше клонированные гены VH и VK в качестве темплатов в реакции PCR для добавления консенсусной последовательности Козака к 5' концу и донора сплайсированного фрагмента к 3' концу нуклеотидной последовательности. Затем последовательности анализируют на отсутствие PCR ошибок, гены VH и VK вставляют в кассеты экспрессирующих векторов, содержащих человеческий С γ I и С. карра, соответственно, с получением pSV2neoVH-huС γ I и pSV2neoV-huС γ . Очищенные в градиенте CsCl плазмиды ДНК векторов тяжелой и легкой цепи используют для трансфекции клеток COS путем электропорации. После 48 ч инкубации, культуральную надосадочную жидкость анализируют методом ELISA для подтверждения наличия приблизительно 200 нг/мл химерного IgG. Клетки собирают и получают тотальную РНК. Первую цепь кДНК синтезируют из тотальной РНК, используя в качестве праймера oligo dT. Эту кДНК используют в качестве темплата в PCR для генерирования ДНК фрагментов Fd и карра. Для гена Fd, проводят PCR, используя 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO: 44) в качестве 5' праймера и 3' праймер (5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTTGCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45), полученный из CH1. Подтверждают, что последовательность ДНК содержит полноразмерные VH и домен CH1 человеческого IgG1. После проведения расщепления соответствующими ферментами, фрагменты Fd ДНК вставляют в сайты рестрикции HindIII и BamHI в кассету экспрессирующего вектора pSV2dhfr-TUS с получением pSV2dhfrFd. Плазмиду pSV2 производят коммерческие организации, и она состоит из сегментов ДНК, взятых из различных источников: pBR322 ДНК (изображенная тонкой линией) содержит плазмиду pBR322 начала репликации ДНК (pBR ori) и ген резистентности лактамазы к ампициллину (Amp); SV40 ДНК, которая изображена широкими штрихами и маркировкой, содержит плазмиду SV40 начала репликации ДНК (SV40 ori), ранний промотор (от 5' к dhfr и неогенам) и сигнал полиаденилирования (от 3' к dhfr и неогенам). Полученный от SV40 сигнал полиаденилирования (pA) также помещен на 3' конце гена Fd.

В случае гена карра, проводят PCR, используя 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) в качестве 5' праймера и 3' праймер (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 47), полученный из СК. Подтверждают, что последовательность ДНК содержит участки полноразмерного VK и человеческого СК. После расщепления соответствующими ферментами рестрикции, ДНК фрагменты карра вставляют в сайты рестрикции HindIII и BamHI кассеты pSV2neo-TUS экспрессирующего вектора с получением pSV2neoK. Экспрессия обоих генов Fd и карра управляется полученными из HCMV элементами энхансера и промотора. Так как ген Fd не включает в себя остаток цистеиновой аминокислоты, принимающего участие в образовании дисульфидной связи между цепями, этот рекомбинантный химерный Fab содержит нековалентно связанные тяжелые и легкие цепи. Этот химерный Fab обозначен как cFab.

Для получения рекомбинантного Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями, ука-

занный выше ген Fd может быть удлинен с целью включения последовательности, кодирующей 9 дополнительных аминокислот (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 48), из шарнирной области человеческого IgG1. Сегмент ДНК BstEII-BamHI, кодирующий 30 аминокислот на 3' конце гена Fd, может быть замещен сегментами ДНК, кодирующими удлиненный Fd, что в результате дает pSV2dhfrFd/9aa.

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

Для генерации клеточных линий, секретирующих химерный анти-MASP-2 IgG, клетки NSO трансфицируют с помощью очищенной плазмидной ДНК pSV2neoVH-huC. γ 1 и pSV2neoV-huC kappa путем электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии 0,7 мг/мл G418. Клетки выращивают во вращающейся колбе объемом 250 мл в культуральной среде, содержащей сыворотку.

Культуральную надосадочную жидкость из вращающейся пробирки с культурой объемом 100 мл загружают в колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J) объемом 10 мл. Колонку промывают объемом PBS, равным 10 объемам слоя колонки. Связанное антитело элюируют с помощью 50 ммоль цитратного буфера с pH 3,0. К фракции, содержащей очищенное антитело, добавляют равный объем 1 моль Nерес с pH 8,0 для доведения величины pH до 7,0. Остаточные соли удаляют путем замены буфера на PBS путем ультрафильтрации через мембрану Millipore (отсекаемая молекулярная масса 3000). Определяют концентрацию белка очищенного антитела методом с бичинхониновой кислотой (BCA) (Pierce).

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

Для генерирования клеточных линий, секретирующих химерные Fab против MASP-2, клетки CHO трансфицируют с помощью очищенной плазмидной ДНК pSV2dhfrFd (или pSV2dhfrFd/9aa) и pSV2неокарпа путем электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии G418 и метотрексата. Выбранные клеточные линии амплифицируют при возрастающих концентрациях метотрексата. Клетки представляют собой одиночную клетку, субклонированную методом предельного разведения. Высокопродуктивные клеточные линии, субклонированные из одиночных клеток, затем выращивают в вращающейся пробирке объемом 100 мл в культуральной среде, не содержащей сыворотки.

Химерное анти-MASP-2 Fab очищают методом аффинной хроматографии, используя мышиное антиидиотипическое MoAb к MASP-2 MoAb. Антиидиотипическое MASP-2 MoAb может быть получено путем иммунизации мыши с помощью мышиного MoAb против MASP-2, конъюгированного с гемоцианином лимфы улитки (KLH) и затем скрининга на специфичное связывание с MoAb, которое может конкурировать с человеческой MASP-2. Для очистки, 100 мл надосадочной жидкости из культуры клеток CHO, продуцирующих cFab или cFab/9aa, загружают в колонку для аффинной хроматографии вместе с антиидиотипическим MASP-2 MoAb. Затем колонку тщательно промывают с помощью PBS перед тем, как связанный Fab элюируют с помощью 50 ммоль диэтиламина с pH 11,5. Остаточные соли удаляют путем замены буфера, как описано выше. Концентрацию белка очищенного Fab определяют методом с бичинхониновой кислотой (BCA) (Pierce).

Способность химерных MASP-2 IgG, cFab и cFab/9aa ингибировать MASP-2 зависимые пути активации комплемента может быть определена путем проведения исследования ингибирования, описанного в примере 2 или примере 7.

Пример 7.

В этом примере описывается исследование расщепления C4 *in vitro*, используемое в качестве функционального скрининга для идентификации MASP-2 ингибирующих средств, способных блокировать MASP-2 зависимую активацию комплемента через L-фиколин/P35, H-фиколин, M-фиколин или маннан.

Исследование расщепления C4. Исследование расщепления C4 описано в публикации Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001, при котором измеряют активацию лектинового пути, вызываемую липотейхоевой кислотой (LTA) из золотистого стафилококка, которая связывает L-фиколин.

Реагенты. Фиксированный в формалине препарат золотистого стафилококка (DSM20233) готовят следующим образом: выращивают бактерии выращивали в течение ночи при 37°C в питательной среде на основе триптон-соевого кровяного агара, затем три раза промывают с помощью PBS, затем фиксируют в течение 1 ч при комнатной температуре в смеси PBS/0,5% формалина, и три раза дополнительно промывают с помощью PBS, и затем ресуспендируют в покрывающем буфере (15 ммоль Na₂CO₃, 35 ммоль NaHCO₃, pH 9,6).

Исследование. Лунки титрационного микропланшета Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покрывают 100 мкл фиксированного в формалине препарата золотистого стафилококка DSM20233 (OD₅₅₀=0,5) в покрывающем буфере с 1 мкг L-фиколина. После инкубации в течение ночи, лунки блокируют с помощью 0,1% раствора сывороточного альбумина человека (HSA) в TBS (10 ммоль Tris-HCl, 140 ммоль NaCl, pH 7,4), затем промывают с помощью TBS, содержащего 0,05% Tween 20 и 5 ммоль CaCl₂ (промывочный буфер). Образцы человеческой сыворотки разбавляют в 20 ммоль Tris-HCl, 1 моль NaCl, 10 ммоль CaCl₂, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, что предотвращает активацию эндогенного C4 и приводит к диссоциации комплекса C1 (состоящий из C1q, C1r и C1s). Добавляли к образцам сыворотки в различных концентрациях MASP-2 ингибирующие средства, включающие MoAb против MASP-2 и ингибирующие пептиды. Разведенные образцы добавляют в планшет и инкубируют в течение ночи при 4°C. Через 24 ч планшеты тщательно промывают с помощью промывочного буфера, затем добавляют в каждую лунку 0,1 мкг очищенного человеческого C4 (полученного, как описано в пуб-

ликации Dodds, A.W, Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл 4 ммоль барбитала, 145 ммоль NaCl, 2 ммоль CaCl₂, 1 ммоль MgCl₂, pH 7,4. После выдержки в течение 1,5 ч при 37°C, планшеты снова промывают, и выявляют отложение C4b, используя конъюгированный с щелочной фосфатазой куриный античеловеческий C4c (полученный от фирмы Immunsystem, Uppsala, Sweden), и производят измерение, используя для колориметрического определения субстрат п-нитрофенилфосфата.

Исследование C4 на маннанае. Описанное выше исследование адаптируют для измерения активации лектинового пути посредством MBL путем нанесения на планшет слоя маннана и LSP перед добавлением сыворотки, смешанной с различными MASP-2 ингибирующими средствами.

Исследование C4 на Н-фиколине (антиген Nakata). Описанное выше исследование адаптируют для измерения активации лектинового пути посредством Н-фиколина путем нанесения на планшет слоя Н-фиколина и LPS перед добавлением сыворотки, смешанной с различными MASP-2 ингибирующими средствами.

Пример 8.

В описанном далее исследовании продемонстрировано наличие классического пути активации у немутантных мышей и MASP-2/-мышей.

Методы. Иммуные комплексы генерировали *in situ* путем нанесения на титрационные микропланшеты (Maxisorb, Nunc, № по каталогу 442404, Fisher Scientific) слоя 0,1% раствора сывороточного альбумина человека в 10 ммоль Tris, 140 ммоль NaCl, pH 7,4 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C с овечьей антисывороткой против цельной сыворотки (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland), разведенной в соотношении 1:1000 в TBS/tween/Ca²⁺. Получены образцы сыворотки от немутантных мышей и MASP-2/- мышей и добавляли их в планшеты с нанесенным слоем. Готовили контрольные образцы, которые содержали образцы сыворотки немутантных мышей и MASP-2/- мышей с резко сниженным уровнем C1q. Мышиную сыворотку с резко сниженным уровнем C1q готовили, используя белок А, связанный с магнитными частицами Dynabeads Dynal Biotech, Oslo, Norway), с нанесенным на них кроличьими античеловеческими C1q IgG (Dako, Glostrup, Denmark), в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Планшеты инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Связанный C3b обнаруживали с помощью поликлонального антитела против человеческого C3c (Dako A 062), разбавленного в TBS/tw/Ca⁺⁺ в соотношении 1:1000. Вторичным антителом является козий антикроличий IgG.

Результаты. На фиг. 7 показаны относительные уровни отложения C3b на планшетах, покрытых IgG, в сыворотке немутантных мышей, сыворотке MASP-2/- мышей, сыворотке немутантных мышей с резко сниженным C1q и сыворотке MASP-2/-мышей с резко сниженным C1q. Эти результаты демонстрируют, что классический путь остается незатронутым у MASP-2/- мышей.

Пример 9.

В описанном далее исследовании проводится анализ способности MASP-2 ингибирующего средства блокировать классический путь активации путем изучения действия MASP-2 ингибирующего средства в условиях, при которых классический путь инициируется иммунными комплексами.

Методы. Для исследования действия MASP-2 ингибирующего средства в условиях, при которых классический путь инициируется иммунными комплексами, три экземпляра сыворотки по 50 мкл, содержащие 90% NHS, инкубируют при 37°C в присутствии 10 мкг/мл иммунного комплекса (IC) или PBS, и, параллельно, инкубируют при 37°C еще три экземпляра образца (+/-IC), которые содержат 200 нмоль моноклонального антител против пропердина. После инкубации в течение 2 ч при 37°C, во все образцы добавляют 13 ммоль EDTA с целью прекратить дальнейшую активацию комплемента, после чего все образцы немедленно охлаждают до 5°C. Затем образцы

хранят при температуре -70°C до момента их использования в анализе продуктов активации комплемента (C3a и sC5b-9), используя наборы ELISA (Quidel, номера по каталогу A015 и A009) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Пример 10.

В этом примере описывается идентификация высокоаффинных фрагментов антител Fab2 против MASP-2, которые блокируют активность MASP-2.

Уровень изученности проблемы и актуальность. MASP-2 представляет собой сложный белок со множеством отдельных функциональных доменов, включающий сайт (сайты) связывания для MBL и фиколинов, каталитический сайт серин-протеазы, сайт связывания для протеолитического субстрата C2, сайт связывания для протеолитического субстрата C4, сайт расщепления MASP-2 для самоактивации зимогена MASP-2 и два связывающих сайта Ca⁺⁺. Были идентифицированы фрагменты Fab2 антител, которые связываются с высокой аффинностью с MASP-2, и идентифицированные фрагменты Fab2 испытывали в функциональном исследовании для определения их способности блокировать функциональную активность MASP-2.

Для блокирования функциональной активности MASP-2, антитело или фрагмент Fab2 антитела должны связывать и негативно воздействовать на структурный эпитоп на MASP-2, который необходим для функциональной активности MASP-2. Поэтому многие или все высокоаффинные связывающие фрагменты Fab2 антител против MASP-2 могут не ингибировать функциональную активность MASP-2,

если они не связываются со структурными эпитопами на MASP-2, которые непосредственно обуславливают функциональную активность MASP-2.

Функциональное исследование, в котором измеряют ингибирование C3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" фрагмента Fab2 антитела против MASP-2. Известно, что основной физиологической функцией MASP-2 в лектиновом пути является генерирование следующего функционального компонента пути комплемента, опосредованного лектином, а именно C3-конвертазы лектинового пути. C3 конвертаза лектинового пути представляет собой особо важный ферментный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 на C3a и C3b. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); однако функциональная активность MASP-2 необходима для генерации двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые включают C3-конвертазу лектинового пути. Кроме того, оказывается, что все перечисленные выше отдельные виды функциональной активности MASP-2 являются необходимыми, для того чтобы MASP-2 генерировала C3-конвертазу лектинового пути. По этим причинам, считают, что предпочтительным исследованием с целью оценки "блокирующей активности" фрагмента Fab2 антитела против MASP-2 является функциональное исследование, в котором измеряет ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути.

Генерирование высокоаффинных фрагментов Fab2. Для создания высокоаффинных фрагментов Fab2 к белку крысиной MASP-2 (SEQ ID NO: 55), использовали фаговый дисплей библиотеки последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих антител и метод автоматизированной селекции антител для идентификации Fab2, которые взаимодействуют с представляющими интерес выбранными лигандами. Для скрининга антител использовали известное количество белка крысиной MASP-2 (~1 мг, > 85% чистоты). Для отбора антител с наилучшей аффинностью было проведено три раунда амплификации. Приблизительно 250 различных хитов, экспрессирующих фрагменты антител, были отобраны для скрининга методом ELISA. Высокоаффинные хиты затем секвенировали для определения уникальности различных антител.

Очищали пятьдесят уникальных антител против MASP-2, и 250 мкг каждого очищенного антитела Fab2 использовали для определения характеристик аффинности связывания с MASP-2 и функционального тестирования пути активации комплемента, как это более подробно описано.

Исследования, проводимые с целью оценки ингибирующей (блокирующей) активности фрагментов Fab2 антител против MASP-2.

1. Исследование по измерению ингибирования образования C3-конвертазы лектинового пути.

Уровень изученности проблемы. C3-конвертаза лектинового пути представляет собой ферментный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 на два потенциальных провоспалительных фрагмента, анафилотоксин C3a и опсонин C3b. По-видимому, образование C3-конвертазы является ключевой стадией лектинового пути с точки зрения опосредования воспаления. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a), поэтому, антитела против MASP-2 (или Fab2) не будут непосредственно ингибировать активность уже существующей C3-конвертазы. Однако активность серин-протеазы MASP-2 необходима для генерации двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые включают в себя C3-конвертазу лектинового пути. Поэтому, фрагмент Fab2 антитела против MASP-2, ингибирующий функциональную активность MASP-2 (то есть блокирующий анти-MASP-2 Fab2) будет ингибировать с самого начала образование C3-конвертазы лектинового пути. C3 содержит в качестве части своей структуры необычную и очень реакционноспособную тиоэфирную группу. После расщепления C3 с помощью C3-конвертазы, тиоэфирная группа в C3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминокислотными группами макромолекул, иммобилизованных на дне пластмассовых лунок, при помощи эфирных или амидных связей, что облегчает определение C3b при использовании метода анализа ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В описанном ниже методе измерения образования C3-конвертазы, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 минут при 37°C с разведенной крысиной сывороткой с целью активации лектинового пути. Затем лунки промывали и определяли C3b, иммобилизованный в лунках, используя стандартные методы ELISA. Количество генерированного в данном исследовании C3b является прямым отображением образовавшейся с самого начала C3-конвертазы лектинового пути. В этом исследовании испытывали фрагменты Fab2 антител против MASP-2 при выбранных концентрациях на их способность ингибировать образование C3-конвертазы и последующую генерацию C3b.

Методы.

96-луночные планшеты со средней степенью связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенном в 50 ммоль карбонатного буфера с pH 9,5, при 1 мкг маннана в 50 мкл буфера на лунку. После инкубации в течение ночи, каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Затем каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разбавляли до выбранных концентраций в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 ммоль барбитала, 141 ммоль NaCl, 1,0 ммоль MgCl, 2,0 ммоль CaCl_2 , 0,1% желатина, pH 7,4) при 5°C. Добавляли 0,5% кры-

синой сыворотки в каждый образец при 5°C, и переносили 100 мкл в каждую лунку. Планшеты накрывали крышками и инкубировали в течение 30 минут на водяной бане при 37°C с целью инициирования активации комплемента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл раствора PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем промывали два раза с помощью 200 мкл PBS. Раствор первичных антител с разбавлением 1:10000 (кроличьи против человеческого C3, DAKO A0062) в объеме 100 мкл на лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5 раз с помощью 200 мкл PBS. Раствор вторичных антител с разбавлением 1:10000 (конъюгат пероксидазы с козым против кроличьего IgG, American Qualex A102PU) в объеме 100 мкл на лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием на аппарате для встряхивания. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл на лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 М раствора H_3PO_4 в количестве 100 мкл на лунку и измеряли OD_{450} .

2. Исследование по измерению ингибирования MASP-2 зависимого расщепления C4.

Уровень изученности проблемы. Активность серин-протеазы MASP-2 является высокоспецифичной, и были идентифицированы только два белковых субстрата MASP-2, а именно C2 и C4. Расщепление C4 приводит к образованию C4a и C4b. Fab2 против MASP-2 может связываться со структурными эпитопами на MASP-2, которые непосредственно участвуют в расщеплении C4 (например, связывающий сайт MASP-2 для C4; каталитический сайт серин-протеазы MASP-2), и вследствие этого ингибирует функциональную активность MASP-2 по расщеплению C4.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В описанном ниже методе измерения активности MASP-2 по расщеплению C4, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 минут при 37°C с разведенной крысиной сывороткой с целью активации лектинового пути. Так как первичного антитела, используемые в этом методе ELISA, распознают только человеческий C4, то разбавленную крысиную сыворотку дополняли также человеческим C4 (1,0 мкг/мл). Затем лунки промывали и анализировали на человеческий C4b, иммобилизованный в лунках, используя стандартные методы ELISA. Количество C4b, генерируемое в этом исследовании, является мерой MASP-2 зависимой активности расщепления C4. В этом исследовании испытывали фрагменты Fab2 антител против MASP-2 при выбранных концентрациях на их способность ингибировать расщепление C4.

Методы. 96-луночные планшеты со средней степенью связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенном в 50 ммоль карбонатного буфера с pH 9,5, при 1 мкг маннана в 50 мкл буфера на лунку. Каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разбавляли до выбранных концентраций в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 ммоль барбитала, 141 ммоль NaCl, 1,0 ммоль $MgCl$, 2,0 ммоль $CaCl_2$, 0,1% желатина, pH 7,4) при 5°C. В эти образцы также вводили 1,0 мкг/мл человеческого C4 (Quidel). В описанные выше образцы добавляли 0,5% крысиной сыворотки при 5°C, и переносили 100 мкл в каждую лунку. Планшеты накрывали крышками и инкубировали в течение 30 минут на водяной бане при 37°C с целью инициирования активации комплемента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл раствора PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем промывали два раза с помощью 200 мкл PBS. Раствор конъюгированного с биотином куриного против человеческого C4 (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) с разбавлением 1:700 в объеме 100 мкл на лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Затем каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл на лунку конъюгированного с пероксидазой стрептавидина с концентрацией 0,1 мкг/мл (Pierce Chemical #21126) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл BSA, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным перемешиванием на аппарате для встряхивания. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл на лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 минут. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 М раствора H_3PO_4 в количестве 100 мкл на лунку и измеряли OD_{450} .

3. Анализ связывания фрагмента Fab2 крысиного антитела против MASP-2 с "нативной" крысиной MASP-2.

Уровень изученности проблемы. MASP-2 обычно присутствует в плазме в форме димерного комплекса MASP-2, который также включает специфические лектиновые молекулы (маннозсвязывающий белок (MBL) и фиколины). Поэтому, если возникает интерес к исследованию связывания фрагмента Fab2 антитела против MASP-2 с физиологически релевантной формой MASP-2, важно разработать анализ свя-

зывания, в котором используется взаимодействие в плазме между Fab2 и "нативной" MASP-2, а не с очищенным рекомбинантным MASP-2. В этом анализе связывания, сначала иммобилизовали на лунках, покрытых маннаном, комплекс "нативной" MASP-2 с MBL из 10%-ной крысиной сыворотки. Затем исследовали аффинность связывания различных фрагментов Fab2 антител против MASP-2 с иммобилизованной "нативной" MASP-2, используя стандартный метод анализа ELISA.

Методы. 96-луночные планшеты высокой степени связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенным в 50 ммоль карбонатного буфера, pH 9,5 в количестве 1 мкг/50 мкл на лунку. Каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 0,5% обезжиренным сухим молоком в PBST (PBS с 0,05% Tween 20) в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Каждую лунку три раза промывали с помощью 200 мкл промывочного буфера TBS/Tween/Ca⁺⁺ (забуференный Tris физиологический раствор, 0,5% Tween 20, содержащий 5,0 ммоль CaCl₂, pH 7,4. Приготавливали на льду 10% крысиную сыворотку в связывающем буфере с высоким содержанием солей (20 ммоль Tris, 1,0 ммоль NaCl, 10 ммоль CaCl₂, 0,05% Triton-X100, 0,1% (масса в единице объема) бычьего сывороточного альбумина с pH 7,4). Добавили 100 мкл на лунку и инкубировали в течение ночи при 5°C. Затем лунки три раза промывали с помощью 200 мкл промывочного буфера TBS/Tween/Ca⁺⁺. Затем лунки промывали два раза с помощью 200 мкл PBS. Добавляли в лунки 100 мкл на лунку выбранную концентрацию фрагмента Fab2 антитела против MASP-2, разведенную в буфере GVB, содержащем Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺, (4,0 ммоль барбитала, 141 ммоль NaCl, 1,0 ммоль MgCl, 2,0 ммоль CaCl₂, 0,1% желатина, pH 7,4) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл на лунку конъюгированного с HRP фрагмента Fab2 козьего антитела (Biogenesis номер по каталогу 0500-0099), разведенного в соотношении 1:5000 в 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в PBS, и инкубировали в течение часа при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз с помощью 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл на лунку пероксидазного субстрата TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 70 минут. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 ммоль H₃PO₄ в количестве 100 мкл на лунку и затем измеряли OD₄₅₀.

Результаты.

Для проведения скрининга методом анализа ELISA были отобраны приблизительно 250 различных фрагментов Fab2, которые реагируют с высокой аффинностью с белком крысиной MASP-2. Эти высокоаффинные Fab2 секвенировали с целью определения уникальности различных антител, и 50 уникальных антител против MASP-2 подвергали очистке для дополнительного исследования. 250 мкг каждого очищенного фрагмента Fab2 антитела использовали для определения характеристик аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути активации комплемента. Результаты этого исследования приведены в табл. 6.

Таблица 6
Фрагменты fab2 антител против masp-2,
которые блокируют лектиновый путь активации комплемента

Фрагмент Fab2 антитела №	C3-конвертаза IC ₅₀ (нМ)	K _d	Расщепление C4 IC ₅₀ (нМ)
88	0,32	4,1	не определяли
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	не определяли
81	0,54	2,0	не определяли
66	0,92	4,5	не определяли
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	не определяли
60	1,6	3,1	не определяли
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	не определяли
49	2,8	8,5	<2 нМ
89	3,0	2,5	не определяли
71	3,0	10,5	не определяли
87	6,0	2,5	не определяли
67	10,0	7,7	не определяли

Как показано выше в табл. 6, из 50 подвергнутых испытанию фрагментов Fab2 антител против MASP-2, семнадцать Fab2 были идентифицированы как Fab2, блокирующие MASP-2, которые потенциально ингибируют образование C3-конвертазы с величиной IC₅₀ равной или меньшей, чем 10 нмоль Fab2 (34% положительных результатов поиска). Восемь из семнадцати идентифицированных Fab2 имеют величину IC₅₀ в диапазоне субнаномолярных значений. Кроме того, все приведенные в табл. 6 семнадцать Fab2, блокирующих MASP-2, обеспечивают практически полное ингибирование образования C3-конвертазы при исследовании C3-конвертазы лектинового пути. На фиг. 8А графически представлены результаты исследования образования C3-конвертазы для фрагмента Fab2 антитела № 11, который является типичным представителем среди других фрагментов Fab2 антител, подвергнутых испытанию, ре-

зультаты которых приведены в табл. 6. Это является важным фактором, так как теоретически возможно, что "блокирующий" фрагмент Fab2 может только частично ингибировать функцию MASP-2 даже в том случае, когда каждая молекула MASP-2 связывается с Fab2.

Несмотря на то что маннан является хорошо изученным активатором лектинового пути, тем не менее, существует теоретическая возможность того, что присутствие антител против маннана в крысиной сыворотке может также активировать классический путь и генерировать C3b посредством C3-конвертазы классического пути. Однако каждый из семнадцати блокирующих фрагментов Fab2 антител против MASP-2, перечисленных в этом примере, потенциально ингибируют генерирование C3b (>95%), таким образом, демонстрируя специфичность данного исследования для C3-конвертазы лектинового пути.

Для всех семнадцати блокирующих Fab2 также проводили анализ связывания с целью подсчета кажущейся Kd для каждого. Результаты исследований по связыванию фрагментов Fab2 крысиных антител против MASP-2 с нативной крысиной MASP-2 для шести из блокирующих Fab2 также приведены в табл. 6. На фиг. 8B графически представлены результаты исследования связывания с фрагментом Fab2 антитела № 11. Аналогичные исследования по связыванию также проводили для других Fab2, их результаты представлены в табл. 6. В целом, величины Kd, полученные для связывания каждого из шести Fab2 с "нативной" MASP-2, достаточно точно соответствуют величинам IC₅₀ для Fab2 в функциональном исследовании конвертазы C3. Существует доказательство того, что MASP-2 подвергается конформационному изменению от "неактивной" формы к "активной" форме после инициации протеазной активности (Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). В нормальной крысиной плазме, используемой в исследовании образования C3-конвертазы, MASP-2 присутствует первоначально в форме "неактивной" конформации зимогена. В отличие от этого, при анализе связывания, MASP-2 присутствует как часть комплекса с MBL, связанным с иммобилизованным маннаном; поэтому, MASP-2, по-видимому, будет находиться в "активной" конформации (Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). Следовательно, не следует ожидать точного соответствия между величинами IC₅₀ и Kd для каждого из семнадцати блокирующих Fab2, подвергнутых испытанию в этих двух функциональных исследованиях, так как в каждом исследовании, Fab2 мог связывать различные конформационные формы MASP-2. Тем не менее, очевидно, что, за исключением Fab2 № 88, имеется достаточно точное соответствие между величиной IC₅₀ и величиной кажущейся Kd для каждого из других шестнадцати Fab2, подвергнутых испытанию в двух исследованиях (см. табл. 6).

Некоторые из блокирующих Fab2 оценивали на их способность ингибировать MASP-2 зависимое расщепления C4. На фиг. 8C графически представлены результаты исследования расщепления C4, которые демонстрируют ингибирование с помощью Fab2 № 41 с величиной IC₅₀=0,81 нмоль (см. табл. 6). Как показано на фиг. 9, было обнаружено, что все подвергнутые испытанию Fab2 ингибировали расщепление C4 с величиной IC₅₀, аналогичной величинам, полученным в исследовании C3-конвертазы (см. табл. 6).

Несмотря на то что маннан является хорошо изученным активатором лектинового пути, тем не менее, существует теоретическая возможность того, что присутствие антител против маннана в крысиной сыворотке может также активировать классический путь и генерировать C4b в результате C1s-опосредованного расщепления C4. Однако были идентифицированы несколько фрагментов Fab2 антител против MASP-2, которые потенциально ингибируют генерацию C4b (> 95%), таким образом, демонстрируя специфичность этого исследования расщепления C4, опосредованного MASP-2. C4, так же, как и C3, содержит необычную и высоко реакционноспособную тиоэфирную группу в качестве части структуры. После расщепления C4 под воздействием MASP-2 в этом исследовании, тиоэфирная группа на C4b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминокетонами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок посредством эфирных или амидных связей, таким образом, облегчая определение C4b при проведении анализа ELISA.

В этих исследованиях однозначно продемонстрировано, что созданы FAB2, которые обладают высокой аффинностью по отношению к белку MASP-2 и которые блокирует функциональную активность C4 и C3-конвертазы, в результате чего предотвращается активация лектинового пути.

Пример 11.

В этом примере описывается картирование эпитопов некоторых из блокирующих фрагментов Fab2 крысиных антител против MASP-2, которые были генерированы, как описано в примере 10.

Методы.

Как показано на фиг. 10, экспрессировали в клетках CHO, используя вектор pED4, следующие белки, все с N-терминальными 6X His-метками (гистаминовыми метками):

крысиная MASP-2A, полноразмерный белок MASP-2, инактивированный путем замены серина в активном центре на аланин (S613A); крысиная MASP-2K, полноразмерный белок MASP-2, измененный с целью снижения самоактивации (R424K);

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

CUBI/EGF-подобный, N-терминальный фрагмент крысиной MASP-2, который содержит только

CUBI и EGF-подобный домены.

Эти белки очищали от культуральных надосадочных жидкостей методом никель-аффинной хроматографии, описанной ранее (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

С-терминальный полипептид (CCPII-SP), содержащий CCPII и домен серин-протеазы крысиной MASP-2, экспрессировали в кишечной палочке в качестве слитого с тиоредоксином белка, используя pTrxFus (Invitrogen). Белок был очищен от клеточных лизатов, используя смолу для аффинной хроматографии Thiobond. Слитый с тиоредоксином белок экспрессировали из пустого pTrxFus в качестве отрицательного контроля.

Все рекомбинантные белки подвергали диализу в буфере TBS, и их концентрации определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм.

Дот-блот анализ.

На нитроцеллюлозную мембрану наносили в форме пятен последовательные разведения пяти рекомбинантных полипептидов MASP-2, описанных выше и показанных на фиг. 10 (и полипептид тиоредоксина в качестве отрицательного контроля для полипептида CCPII-серин-протеазы). Количество нанесенного в форме пятен белка изменялось в диапазоне от 100 нг до 6,4 пкг при каждом следующем разведении в пять раз. В последующих экспериментах, количество нанесенного в форме пятен белка изменялось в диапазоне от 50 нг до 16 пкг, также при каждом следующем разведении в пять раз. Мембраны блокировали с помощью 5% обезжиренного сухого молока в TBS (блокирующий буфер), затем инкубировали с 1,0 мкг/мл фрагмента Fab2 антитела против MASP-2 в блокирующем буфере (содержащем 5,0 нмоль Ca^{2+}). Связанные фрагменты Fab2 определяли, используя HRP-конъюгированный фрагмент Fab человеческого антитела (AbD/Serotec; разведенный в соотношении 1/10000) и набор для определения ECL (Amersham). Одну мембрану инкубировали с поликлональным кроличьим антителом против человеческой MASP-2 (описанным в Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)) в качестве положительного контроля. В этом случае, связанное антитело определяли, используя HRP-конъюгированного козы анти-тело против кроличьего IgG (Dako; разведенное в соотношении 1/2000).

Анализ связывания MASP-2.

На планшеты для проведения анализа методом ELISA наносили слой рекомбинантного MASP-2A или CUBI-II полипептида в карбонатном буфере (pH 9,0) в количестве 1,0 мкг на лунку в течение ночи при 4°C. Лунки блокировали 1% BSA в TBS, затем добавляли последовательные разведения фрагментов Fab2 антител против MASP-2 в TBS, содержащий 5,0 нмоль Ca^{2+} . Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После тройного промывания в TBS/tween/ Ca^{2+} , добавляли HRP-конъюгированный фрагмент Fab человеческого антитела (AbD/Serotec), разведенный в соотношении 1/10000 в TBS/ Ca^{2+} , и планшеты снова инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанное антитело обнаруживали, используя набор субстрата пероксидазы TMB (Biorad).

Результаты.

Результаты дот-блот анализа, демонстрирующие реакционную способность Fab2 при взаимодействии с различными полипептидами MASP-2, представлены ниже в табл. 7. Численные значения, приведенные в табл. 7, обозначают количество нанесенного в форме пятен белка, необходимое для подачи сигнала с приблизительно половиной его максимальной интенсивности. Как показано, все полипептиды (за исключением только сливающихся клеток тиоредоксина) распознавали с помощью антитела положительного контроля (сыворотка поликлонального человеческого антитела против MASP-2, продуцированная в кроликах).

Таблица 7
Реакционная способность в отношении различных рекомбинантных полипептидов крысиного masp-2 в дот-блот анализе

Фрагмент Fab2 антитела №	MA SP-2A	CUBI II	CUBI/EGF-подобный	CCPII SP	Тиоредоксин
40	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
41	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
11	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
49	0,16 нг	NR	NR	>20 нг	NR
52	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
57	0,032 нг	NR	NR	NR	NR
58	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
60	0,4 нг	0,4 нг	NR	NR	NR
63	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
66	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
67	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
71	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
81	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
86	0,4 нг	NR	NR	10 нг	NR
87	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
Положительный контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	NR

Регистрировали активность лектинового пути в течение второй и третьей недели, полное восста-

новление лектинового пути у мышей происходило на 17 день после введения моноклонального антитела против MASP-2. NK=отсутствие реакции. Антитело для положительного контроля представляет собой сывороточное поликлональное антитело против человеческой MASP-2, продуцированное в кроликах.

Все фрагменты Fab2 антител взаимодействовали с MASP-2A, а также с MASP-2K (данные не показаны). Большинство фрагментов Fab2 распознавали полипептид CCP-II-SP, но не N-терминальные фрагменты. Двумя исключениями являются Fab2 № 60 и Fab2 № 57. Fab2 № 60 распознает MASP-2A и фрагмент CUBI-II, но не CUBI/EGF-подобный полипептид или CCP-II-SP полипептид, что позволяет предположить, что он связывается с эпитопом в CUBI, или перекрывает домен CUBI и EGF-подобный домен. Fab2 № 57 распознает MASP-2A, но ни один из подвергнутых испытаниям фрагментов MASP-2, что указывает на то, что этот фрагмент Fab2 антитела распознает эпитоп в CCP-I. Fab2 № 40 и № 49 связывались только с полной MASP-2A. В анализе связывания методом ELISA, изображенном на фиг. 11, Fab2 № 60 также связывался с полипептидом CUBI-II, хотя при этом уровень кажущейся аффинности был незначительно ниже.

Эти результаты демонстрируют выявление уникальных блокирующих фрагментов Fab2 антител, действующих в отношении многочисленных областей белка MASP-2.

Пример 12.

В этом примере описывается исследование MASP-2^{-/-} мышей в экспериментальной модели ишемии/реперфузии почки на мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность. Поражение почки в результате ишемии/реперфузии (I/R) при температуре тела имеет отношение к ряду клинических состояний, включающих гиповолемический шок, окклюзию почечной артерии и процедуры пережатия.

Ишемия-реперфузия (I/R) почки является важной причиной острой почечной недостаточности, приводящей к смертности в 50% случаев (Levy et al., JAMA 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., N. Engl. J. Med. 334:1448-60, 1996). Посттрансплантационная почечная недостаточность представляет собой общее и опасное для жизни осложнение после трансплантации почек (Nicholson et al., Kidney Int. 58:2585-91, 2000). В настоящее время не существует эффективного метода лечения I/R поражения почек, единственной формой лечения является гемодиализ. Патофизиология I/R поражения почек является весьма сложной. В недавних исследованиях было показано, что лектиновый путь активации комплемента может играть важную роль в патогенезе I/R поражения почек (deVries et al., Am. J. Path. 165:1677-88, 2004).

Методы.

Создали MASP-2^{-/-} мышь, как описано в примере 1, и проводили ее обратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с мышами линии C57B1/6. Шести самцам MASP-2^{-/-} мышей и шести немутантным мышам (+/+) с массой тела 22-25 г вводили путем интраперитонеальных инъекций Нурновел (6,64 мг/кг; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, UK), а затем их анестезировали путем ингаляции изофлюрана (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK). Изофлюран был выбран потому, что он является мягким ингаляционным анестезирующим средством с минимальной гепатотоксичностью; его концентрации продуцируются с высокой точностью, и животные быстро восстанавливаются даже после продолжительной анестезии. Нурновел вводили в связи с тем, что он вызывает состояние нейрорептаналгии у животных, что подразумевает возможность введения меньшей дозы изофлюрана. Животных размещали на теплых подстилках с целью поддержания постоянной температуры тела. Затем производили разрез по средней линии брюшной стенки, и брюшную полость оставляли открытой, используя пару ретракторов. Зачищали соединительную ткань выше и ниже почечной вены и артерии правой и левой почек, и почечную ножку пережимали путем наложения зажимов, используемых при микроаневризме, на 55 минут. Этот период ишемии первоначально был обоснован в результате предыдущего исследования, проведенного в этой лаборатории (Zhou et al., J. Clin. Invest. 105:1363-71 (2000)). Кроме того, стандартное время продолжительности ишемии, составляющее 55 мин, выбирали после проведения исследования ишемии методом титрования, и было обнаружено, что время 55 мин провоцирует стойкое поражение, которое является также обратимым, с низким уровнем смертности, составляющим менее 5%. После окклюзии, в брюшную полость вводили 0,4 мл теплого физиологического раствора (37°C), и затем брюшную полость закрывали на период ишемии. После удаления зажимов, используемых при микроаневризме, проводили наблюдения за почками до тех пор, пока не происходило изменение их окраски, что указывало на возобновление кровообращения в почках. В брюшную полость дополнительно вводили 0,4 мл теплого физиологического раствора, и на разрез накладывали швы, после чего животных возвращали в их клетки. Отбирали образцы крови из хвостов животных через 24 ч после удаления зажимов, и через 48 ч мышей умертвляли и собирали дополнительные образцы крови.

Оценка повреждения почек. Оценивали функцию почек у шести самцов MASP-2^{-/-} мышей и шести немутантных мышей (+/+) через 24 и через 48 ч после реперфузии. Определение креатинина в крови проводили методом масс-спектрометрии, который обеспечивает получение воспроизводимых результатов при определении индекса функции почек (чувствительность <1,0 мкмоль/л). На фиг. 12 графически представлены данные по клиренсу азота мочевины крови для контрольной группы немутантных мышей линии C57B1/6 и группы MASP-2^{-/-} мышей через 24 ч и через 48 ч после реперфузии. Как показано на фиг. 12, у MASP-2^{-/-} мышей обнаруживалось значительное снижение количества мочевины крови через

24 и через 48 ч в сравнении с контрольными немутантными мышами, что указывает на защитный эффект функционального характера от повреждения почек в модели ишемического реперфузионного поражения.

В целом, повышенный уровень мочевины в крови наблюдался как у немутантных мышей (+/+), так и у MASP-2(-/-) мышей, через 24 и через 48 ч после хирургической процедуры и ишемического инсульта. Уровень мочевины в крови у неишемического прооперированного немутантного животного (+/+) определяли отдельно, и он составлял 5,8 ммоль/л. В дополнение к данным, представленным на фиг. 12, у одного MASP-2(-/-) животного обнаруживали практически полную защиту от ишемического инсульта, с показателями 6,8 и 9,6 ммоль/л через 24 ч и через 48 ч соответственно. Это животное исключали из исследуемой группы как животное, резко отличающееся от других, у которого не может возникнуть ишемического повреждения. Поэтому, окончательные результаты исследования, представленные на фиг. 12, включали результаты для 5 MASP-2(-/-) мышей и для 6 немутантных мышей (+/+), и было обнаружено статистически значимое уменьшение мочевины в крови через 24 ч и через 48 ч у MASP-2(-/-) мышей (t-критерий Стьюдента $p < 0,05$). Можно предположить, что эти результаты указывают на то, что ингибирование активности MASP-2 оказывает защитное или терапевтическое действие от повреждения почек, обусловленного ишемией.

Пример 13.

В этом примере описываются результаты, полученные при исследовании, проведенном на экспериментальной модели дегенерации желтого пятна на MASP-2/- мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность. Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) является основной причиной возникновения слепоты в возрасте после 55 лет в промышленно развитых странах. AMD возникает в двух основных формах: в форме неоваскулярной (влажной) AMD и в форме атрофической (сухой) AMD. Неоваскулярная (влажная) форма составляет 90% тяжелых форм потери зрения, связанного с AMD, хотя влажная форма AMD развивается только у приблизительно 20% индивидуумов. Клинические признаки AMD включают множественные друзы, географическую атрофию и хориоидальную неоваскуляризацию (CNV). В декабре 2004, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарств США (FDA) одобрило применение лекарственного препарата макугена (пегаптанаб), нового класса офтальмических лекарственных средств для специфического воздействия и блокирования эффектов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), для лечения влажной (неоваскулярной) формы AMD (Ng et al., *Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006)). Несмотря на то что макуген представляет собой новое перспективное терапевтическое средство для лечения подгруппы пациентов с AMD, тем не менее, остается настоятельная потребность в разработке дополнительных методов этого комплексного заболевания. Многочисленные исследования, проводимые по независимым направлениям, указывают на центральную роль активации комплемента в патогенезе AMD. Патогенез хориоидальной неоваскуляризации (CNV), самой серьезной формы AMD, может включать активацию путей комплемента.

Более двадцати пяти лет назад в публикации Ryan, S.J., *Tr. Am. Ophth. Soc.* LXXVII:707-745, 1979 была описана экспериментальная модель хориоидальной неоваскуляризации (CNV) на животных, вызванной лазерным повреждением (Ryan, S.J., *Tr. Am. Ophth. Soc.* LXXVII: 707-745, 1979). Изначально модель была разработана для использования на макаках-резусах, однако такая же технология уже используется длительное время для разработки аналогичных моделей CNV на целом ряде лабораторных животных, включая мышей (Tobe et al., *Am. J. Pathol.* 153:1641-46, 1998). В этой модели, используют лазерную фотокоагуляцию для разрушения мембраны Бруха, результатом которой является образование CNV-подобных мембран. Индуцированная лазером модель охватывает множество важных проявлений этого заболевания человека (см. недавно опубликованный обзор Ambati et al., *Survey Ophthalmology* 48:257-293, 2003). В настоящее время, индуцированная лазером модель на мышах хорошо обоснована, и ее широко используют в качестве экспериментальной основы в большом и постоянно растущем количестве научных исследований. Существует общепризнанное мнение, что индуцированная лазером модель имеет достаточное биологическое подобие с хориоидальной неоваскуляризацией (CNV) у человека, и что доклинические исследования патогенеза и ингибирования при помощи лекарственных препаратов, при которых используют эту модель, являются релевантными применительно к CNV у человека.

Методы.

Создали MASP-2(-/-) мышь, как описано в примере 1, и проводили ее обратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с мышами линии C57B1/6. В данном исследовании проводили сравнение результатов, полученных для самцов MASP-2(-/-) мышей и MASP-2(+/+) мышей после лазерного повреждения в процессе протекания индуцированной лазером CNV, ускоренной модели неоваскулярной AMD, уделяя особое внимание объему индуцированной лазером CNV, методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в качестве метода для измерения повреждения ткани, и методом анализа ELISA для определения уровней VEGF, потенциального ангиогенного фактора, вовлеченного в CNV, в ретинальном пигментном эпителии (RPE)/в сосудистой оболочке глаза.

Индуцирование хориоидальной неоваскуляризации (CNV).

Лазерную фотокоагуляцию (532 нм, 200 мВт, 100 мс, 75 мкм; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) проводил на обоих глазах каждого животного на нулевой день один сотрудник, которому было неизвестно, какой группе животных было назначено введение лекарственных препаратов. Лазерные пятна

наносили стандартизированным образом вокруг оптического нерва, используя систему для установки щелевой лампы и покровного стекла в качестве контактной линзы. Морфологической конечной точкой лазерного повреждения считалось появление кавитационного пузырька, признака, который связывали с повреждением мембраны Бруха. Детализация методов и оценка полученных результатов выглядят следующим образом.

Флуоресцентная ангиография. Флуоресцентную ангиографию проводили при помощи камеры и системы формирования изображений (камера TRC 50 1A; система ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) через 1 неделю после лазерной фотокоагуляции. Фотографии получали с использованием линз 20-D, соприкасающихся с линзами фундус-камеры, после интраперитонеальной инъекции 0,1 мл 2,5% флуоресцеина натрия. Специалист по сетчатке глаза, не принимавший участие в лазерной фотокоагуляции или ангиографии, оценивал флуоресцентные ангиограммы в течение одного сеанса, не имея информации о предшествующей манипуляции с животными.

Объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV). Через одну неделю после лазерного повреждения, глаза энуклеировали и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 30 минут при 4°C. Получали глазные бокалы путем удаления передних сегментов и промывали их три раза в PBS, затем дегидратировали и регидратировали путем использования метанола. После двух раз блокирования буфером (PBS с содержанием 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,5% Triton X-100) в течение 30 минут при комнатной температуре, глазные бокалы инкубировали в течение ночи при 4°C с 0,5% флуоресцеин изотиоцианат изолектина B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA), разбавленного с помощью PBS, содержащего 0,2% BSA и 0,1% Triton X-100, который связывает терминальные остатки β -D-галактозы на поверхности эндотелиальных клеток и селективно метит сосудистую сеть мышей. После двух промываний с помощью PBS, содержащего 0,1% Triton X-100, осторожно отслаивали и отделяли нейросенсорную часть сетчатки от оптического нерва. Делали четыре расслабляющих радиальных надреза, и оставшийся комплекс RPE-хориоидальная склера заключали в среду, препятствующую обесцвечиванию препарата (Immu Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories) и удаляли покровное стекло.

Заключенные в среду образцы исследовали с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа (TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany). Сосуды визуализировали путем возбуждения с помощью длины волны 488 нм голубой области видимого спектра аргона и регистрации эмиссии между 515 и 545 нм. Во всех исследованиях изображений использовали объектив для масляной иммерсии с 40-кратным увеличением. Получали горизонтальные оптические срезы (с шагом 1 мкм) с поверхности комплекса RPE-хориоидальная склера. Было выяснено, что самой глубокой фокальной плоскостью, в которой может быть определена окружающая хориоидальная васкулярная сеть, связанная с поражением, являлась дно очага поражения. Любой сосуд, находящийся в области, на которую был нацелен лазер, и который расположен на поверхности указанной выше области, оценивали как CNV. Изображения каждого среза сохраняли в цифровом виде. Измеряли площадь CNV-связанной флуоресценции, используя компьютеризированный анализ изображений с помощью программного обеспечения, прилагаемого к микроскопу (TCS SP; Leica). Суммирование всей области флуоресценции в каждом горизонтальном срезе использовали в качестве показателя, характеризующего объем CNV. Получение изображений осуществлял оператор, которому было неизвестно, какой группе животных было назначено введение лекарственных препаратов.

Так как на возможность каждого лазерного повреждения, приводящего к развитию CNV, влияет его принадлежность к той или иной группе (мышь, глаз и лазерное пятно), сравнивали средние объемы поражения, используя линейную смешанную модель с расщепленными участками с повторяющимися измерениями. Полный фактором участка являлась генетическая группа, к которой принадлежали животные, в тот время как фактором расщепленного участка являлся глаз. Статистическая значимость была определена на уровне 0,05. Проводили апостериорные сравнения средних значений с помощью поправки Бонферрони для множественных сравнений.

Анализ фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) методом ELISA. Через три дня после повреждения с помощью 12 лазерных пятен, комплекс RPE-хориоидея разрушали ультразвуком в лизисном буфере (20 ммоль имидазол-HCl, 10 ммоль KCl, 1 ммоль $MgCl_2$, 10 ммоль EGTA, 1% Triton X-100, 10 ммоль NaF, 1 ммоль молибдата натрия и 1 ммоль EDTA с ингибитором протеазы) на льду в течение 15 минут. Определяли уровни белка VEGF в надосадочной жидкости с использованием набора для анализа методом ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), который позволяет распознать все сплайс-варианты при длине волны от 450 до 570 нм (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), и нормализовали к величине суммарного белка. Дублирующие измерения выполнял оператор, который не участвовал в проведении фотокоагуляции, получении изображений или в проведении ангиографии. Количества VEGF представляли как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения, по меньшей мере, в трех независимых экспериментах и сравнивали, используя U-критерий Манна-Уитни. Нулевую гипотезу отклоняли при $P < 0,05$.

Результаты.

Оценка уровней VEGF.

На фиг. 13А графически представлены уровни белков VEGF в комплексе RPE-хориоидея, выделенном у мышей немутантного типа линии C57B16 и у MASP-2(-/-) мышей в нулевой день. Как показано на фиг. 13А, оценка уровней VEGF указывает на снижение базовых уровней VEGF у мышей MASP-2(-/-) по сравнению с контрольными немутантными мышами линии C57b1. На фиг. 13В графически представлены уровни белков VEGF, измеренные на третий день после индуцированного лазером повреждения. Как показано на фиг. 13В, уровни VEGF были значительно повышались у немутантных мышей (+/+) через три дня после индуцированного лазером повреждения, что согласуется с результатами опубликованных исследований (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 103:2328-33 (2006)). Однако у мышей MASP-2(-/-) наблюдались неожиданно очень низкие уровни VEGF.

Оценка хориоидальной неоваскуляризации (CNV).

Помимо снижения уровней VEGF после индуцированной лазером дегенерации желтого пятна, определяли площадь CNV до и после лазерного поражения. На фиг. 14 графически представлен объем CNV, измеренный у немутантных мышей линии C57b1 и у MASP-2(-/-) мышей на седьмой день после индуцированного лазером повреждения. Как показано на фиг. 14, на седьмой день после индуцированного лазером повреждения у MASP-2(-/-) мышей обнаруживалось приблизительно 30% уменьшение площади CNV по сравнению с контрольной группой немутантных мышей.

Эти данные указывают на снижение уровней VEGF и площади CNV, наблюдаемые у MASP(-/-) мышей по сравнению с контрольными немутантными мышами (+/+), а также на то, что блокирование MASP-2 при помощи ингибитора может оказывать профилактическое или терапевтическое действие при лечении дегенерации желтого пятна.

Пример 14.

В этом примере показано, что активация тромбина может возникать после активации лектинового пути при физиологических условиях, и охарактеризована степень вовлечения в патологический процесс MASP-2. В сыворотке здоровой крысы, активация лектинового пути приводит к активации тромбина (оцениваемой по отложению тромбина) одновременно с активации комплемента (оцениваемой по отложению C4). Как можно увидеть на фиг. 15А и 15В, активация тромбина в этой системе ингибируется блокирующим MASP-2 антителом (в формате Fab2), характеризующаяся кривой концентрация-эффект ингибирования активации тромбина (фиг. 15В), которая проходит параллельно кривой концентрация-эффект ингибирования активации комплемента (Фиг. 28А). Эти данные позволяют предположить, что активация лектинового пути, возникающая при травме, должна приводить к активации как системы комплемента, так и коагулирующей системы, в результате процесса, который полностью зависит от MASP-2. В связи с этим можно предположить, что MASP2 блокирующие антитела могут оказаться эффективными для снижения частоты случаев возникновения избыточной системной коагуляции, например, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, которое является одним из признаков, приводящих к смертности в большинстве случаев травм.

Пример 15.

В этом примере приводятся результаты, полученные при использовании модели локальной реакции Шварцмана диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC) у MASP-2/-дефицитных мышей и MASP-2 (+/+) достаточных мышей с целью оценки роли лектинового при DIC.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Как описано выше, блокада MASP-2 ингибирует активацию лектинового пути и снижает генерацию анафилатоксинов C3a и C5a. Может быть показано, что анафилатоксины C3a являются мощными агрегаторами тромбоцитов *in vitro*, но их участие *in vivo* менее изучено, и высвобождение тромбоцитов и плазмينا при заживлении раны может вовлекать комплемент C3 только во вторую очередь. В этом примере, изучали роль лектинового пути на MASP-2(-/-) мышах и немутантных мышах (+/+), для того чтобы выяснить, является ли необходимым длительный рост активации C3 для генерации диссеминированной внутрисосудистой коагуляции.

Методы.

Используемых в этом исследовании MASP-2(-/-) мышей создавали, как описано в примере 1, и проводили их обратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с мышами линии C57B1/6. В этом эксперименте использовали модель локальной реакции Шварцмана. Локальная реакция Шварцмана (LSR) представляет собой индуцированную липополисахаридом (LPS) реакцию с хорошо изученным участием клеточных и гуморальных элементов врожденной иммунной системы. Хорошо обоснована зависимость LSR от комплемента (Polak, L, et al., Nature 223:738-739 (1969); Fong J.S. et al., J Exp Med 134:642-655 (1971)). В модели LSR, вакцинировали мышей в течение 4 ч с помощью фактора некроза опухолей альфа (500 нг, внутрь мошонки), затем мышей анестезировали и готовили для прижизненной микроскопии мышцы, поднимающей яичко. Для наблюдения выбирали сети посткапиллярных венул (диаметром 15-60 мкм) с хорошим кровотоком (1-4 мм/с). Животных обрабатывали флуоресцирующими антителами, для того чтобы селективно пометить нейтрофилы или тромбоциты. Последовательно сканировали сеть сосудов, и изображения всех сосудов при последнем анализе записали в цифровой форме.

После записи базального состояния микроциркуляции, мышам вводили LPS путем разовой внутривенной инъекции (100 мкг) или отдельно, или с перечисленными ниже средствами. Затем эту же сеть сосудов сканировали каждые 10 минут в течение 1 ч. Идентифицировали специфическую аккумуляцию флуорофоров путем вычитания фоновой флуоресценции и усиления путем порогового представления яркости изображения. По записанным изображениям измеряли интенсивность реакций. Первичной количественной оценкой реакций Шварцмана являлись сводные данные.

В исследованиях, сравнивали MASP-2(+/+) достаточных мышей или немутантных мышей, подвергавшихся воздействию или известного вещества, ослабляющего активацию пути комплемента, фактора из яда кобры (CVF), или ингибитора активации терминальных компонентов комплемента (антагониста C5aR). Результаты (фиг. 16A) показывают, что CVF, также как и антагонист C5aR, предотвращали появление агрегатов в сосудистой сети. Кроме того, MASP-2(-/-) дефицитные мыши (фиг. 16B) также характеризовались полным ингибированием локальной реакции Шварцмана, что подтверждало вовлечение лектинового пути. Эти результаты четко показывают роль MASP-2 в генерации DIC и подтверждают возможность применения ингибиторов MASP-2 для лечения и предотвращения DIC.

Пример 16.

В этом примере описывается исследование MASP-2(-/-) мышей на экспериментальной модели трансплантации почки на мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Оценивали роль MASP-2 в функциональном результате трансплантации, используя экспериментальную модель на мышах.

Методы.

Оценивали функциональный результат трансплантации почки, используя изографт одной почки, односторонне нефрэктомизированным мышам-реципиентам, среди которых реципиентами трансплантата были шесть немутантных мышей (+/+) (B6) и шесть MASP-2(-/-) мышей. Для оценки функции трансплантированной почки, через 5 дней после пересадки у реципиента удаляли оставшуюся нативную почку, и через 24 ч оценивали функцию почки путем измерения уровней азота мочевины крови (BUN).

Результаты.

На фиг. 17 графически представлены уровни азота мочевины крови (BUN) почки у немутантных реципиентов (+/+) и MASP-2(-/-) реципиентов на 6 день после трансплантации почки. Как показано на фиг. 17, сильно повышенные уровни BUN наблюдались у немутантных мышей (+/+) (B6)-реципиентов трансплантата (нормальные уровни BUN у мышей составляют < 5 ммоль), что указывало на почечную недостаточность. В отличие от этого, MASP-2(-/-) мыши-реципиенты изографта характеризовались существенно более низкими уровнями BUN, что указывало на улучшенную функцию почки. Следует отметить, что эти результаты были получены при использовании графтов от немутантных мышей (+/+)-доноров почек, что позволяет предположить, что отсутствие только функционального лектинового пути у реципиента трансплантата является достаточным для достижения положительного терапевтического эффекта.

В совокупности эти результаты указывают на то, что транзитное ингибирование лектинового пути через ингибирование MASP-2 предоставляет собой способ снижения частоты заболеваний и функцию отсроченного трансплантата при трансплантации почки, и что этот подход, по-видимому, может применяться и в других случаях трансплантации.

Пример 17.

В этом примере показано, что MASP-2(-/-) мыши являются устойчивыми к септическому шоку в экспериментальной модели септического полимикробного перитонита на мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Для оценки потенциальных эффектов MASP-2(-/-) при инфекции, проводили исследование на модели лигирования и пункции слепой кишки (CLP), модели полимикробного септического перитонита. Считается, что эта модель наиболее точно имитирует течение септического перитонита у человека. Модель лигирования и пункции слепой кишки (CLP) представляет собой модель, в которой лигируют слепую кишку и пунктируют иглой, что приводит к постоянному проникновению в брюшную полость бактерий, которые через лимфодренаж попадают в кровь и затем разносятся во все органы брюшной полости, вызывая мультиорганную недостаточность и септический шок (Eskandari et al., J Immunol 148 (9):2724-2730 (1992)). Модель CLP имитирует наблюдаемое у пациентов течение сепсиса и индуцирует раннюю гипервоспалительную реакцию с последующей ярко выраженной гиповоспалительной фазой. Во время этой фазы, животные проявляют высокую чувствительность к бактериальным заражениям (Wichterman et al., J. Surg. Res. 29 (2); 189-201 (1980)).

Методы.

Измеряли смертность от полимикробной инфекции при использовании модели лигирования и пункции слепой кишки (CLP) на немутантных (+/+) мышах (n=18) и мышах MASP-2 (-/-) (n=16). Вкратце, MASP-2-дефицитных мышей и однопометных немутантных мышей анестезировали, и временно вводили слепую кишку на поверхность тела и лигировали выше дистального кончика на 30%. После чего, один раз пунктировали слепую кишку иглой диаметром 0,4 мм. Затем слепую кишку возвращали в

брюшную полость, и кожу стягивали зажимами. В течение 14 дней после CLP, проводили непрерывный мониторинг выживаемости мышей, подвергнутых CLP. Через 16 ч после CLP, у мышей собирали перитонеальный смыв для измерения бактериальной нагрузки. Готовили последовательные разведения перитонеального смыва в PBS и инокулировали в чашках со средой Мюллера-Хинтона и затем инкубировали при температуре 37°C в анаэробных условиях в течение 24 ч, после чего определяли бактериальную нагрузку.

Через 16 ч после CLP, также измеряли цитокиновый ответ фактора некроза опухоли альфа на бактериальную инфекцию в легких и селезенке немутантных мышей (+/+) и MASP-2(-/-) мышей методом количественной полимеразной цепной реакции в масштабе реального времени (qRT-PCR). Кроме того, через 16 ч после CLP, количественно определяли методом анализа "sandwich ELISA" уровень фактора некроза опухоли альфа в сыворотке немутантных мышей (+/+) и MASP-2(-/-) мышей.

Результаты.

На фиг. 18 графически представлен процент выживаемости животных, подвергнутых CLP, в зависимости от количества дней, прошедших после процедуры CLP. Как показано на фиг. 18, недостаточность лектинового пути у MASP-2(-/-) мышей не повышает смертность мышей после полимикробной инфекции при использовании модели лигирования и пункции слепой кишки по сравнению с немутантными мышами (+/+). Однако, как показано на фиг. 19, после CLP, в перитонеальном смыве MASP-2(-/-) мышей обнаруживали значительно более высокую бактериальную нагрузку (количество бактерий было приблизительно в 1000 раз больше), чем у однопометных немутантных мышей (+/+). Эти результаты указывают на то, что MASP-2 дефицитные (-/-) мыши проявляют устойчивость к септическому шоку. Пониженное выведение бактерий у MASP-2 дефицитных мышей в этой модели может быть обусловлено нарушением C3b-опосредованного фагоцитоза, как это было продемонстрировано тем, что отложение C3 является MASP-2 зависимым.

Было обнаружено, что цитокиновый ответ фактора некроза опухоли альфа на бактериальную инфекцию не повышался у MASP-2(-/-) мышей в сравнении с контрольными немутантными мышами (+/+) (данные не показаны). Также было обнаружено, что концентрация фактора некроза опухоли альфа в сыворотке у немутантных мышей (+/+) через 16 ч после CLP является значительно более высокой по сравнению с MASP-2(-/-) мышами, у которых уровень фактора некроза опухоли альфа в сыворотке остался практически неизменным. Эти результаты подтверждают, что интенсивный воспалительный ответ на состояние бактериальной инфекции был ослаблен у MASP-2(-/-) мышей, что позволяло животным выжить в присутствии более высокого количества бактерий.

В совокупности, эти результаты демонстрируют потенциальные отрицательные воздействия лектинового пути активации комплемента в случае общего заражения и повышенную смертность пациентов с генерализованным сепсисом. Кроме того, эти результаты показывают, что MASP-2 недостаточность модулирует воспалительный иммунный ответ и снижает уровни экспрессии медиаторов воспаления при сепсисе. Поэтому, можно предположить, что ингибирование MASP-2(-/-) путем введения ингибирующих моноклональных антител против MASP-2 будет эффективным методом ослабления воспалительного ответа у субъекта, страдающего от септического шока.

Пример 18.

В этом примере описывается исследование MASP-2(-/-) мышей на экспериментальной модели интраназальной инфекции на мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) представляет собой грамотрицательный бактериальный патоген оппортунистической инфекции у человека, который вызывает широкий спектр инфекций, особенно у людей с нарушенным иммунитетом. Синегнойная палочка является основным источником приобретенных нозокомиальных инфекций, в частности, внутрибольничной пневмонии. Она также обуславливает существенную заболеваемость и смертность пациентов с кистозным фиброзом (CF). Легочная инфекция синегнойной палочкой характеризуется интенсивным рекрутингом нейтрофилов и значительным воспалением легких, приводящим к обширному повреждению тканей (Palanki M.S. et al., J. Med. Chem 51:1546-1559 (2008)).

В этом примере проводили исследование с целью определения, повышает ли удаление лектинового пути у MASP-2(-/-) мышей восприимчивость к бактериальным инфекциям.

Методы.

Двадцати двум немутантным мышам (+/+), двадцати двум MASP-2(-/-) мышам и одиннадцати C3(-/-) мышам вводили интраназально бактериальный штамм синегнойной палочки. За мышами постоянно наблюдали в течение шести дней после инфицирования и строили кривые Каплана-Майера, показывающие процент выживаемости.

Результаты.

На фиг. 20 представлена кривая процента выживания Каплана-Майера для непутантных мышей (+/+), MASP-2(-/-) мышей или C3(-/-) мышей через шесть дней после инфицирования. Как показано на фиг. 20, не обнаруживалось никаких различий при сравнении MASP-2(-/-) мышей с немутантными мышами (+/+). Однако удаление классического пути (C1q) у C3(-/-) мышей приводило к тяжелой форме

восприимчивости к бактериальной инфекции. Эти результаты показывают, что ингибирование MASP-2 не повышает восприимчивость к бактериальной инфекции, что указывает на возможность снижения частоты возникновения нежелательных воспалительных осложнений у травматологических больных путем ингибирования MASP-2 без ухудшения способности пациента сопротивляться инфекциям, используя классический путь комплемента.

Пример 19.

В этом примере описывается исследование фармакодинамики для типичных высокоаффинных фрагментов Fab2 антител против MASP-2, которые идентифицировали, как описано в примере 10.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Как описано в примере 10, для идентификации антител с высокой аффинностью, которые блокируют лектиновый путь у крыс, использовали белок крысиной MASP-2 для поиска в фаговом дисплее библиотек антител. Эта библиотека была предназначена для обеспечения большого иммунологического разнообразия, и была создана с использованием только последовательности генов иммуноглобулинов человека. Как показано в примере 10, в результате скрининга методом анализа ELISA было идентифицировано приблизительно 250 индивидуальных клонов фагов, которые связываются с белком крысиной MASP-2 с высокой аффинностью. Секвенирование этих клонов позволило идентифицировать 50 уникальных фагов, кодирующих антитело MASP-2. Из этих клонов экспрессировали белок Fab2, очищали его и исследовали на предмет аффинности связывания MASP-2 и функционального ингибирования лектинового пути комплемента.

Как показано в табл. 6 примера 10, в результате этого анализа было идентифицировано 17 фрагментов Fab2 антител против MASP-2 с функциональной блокирующей активностью (с коэффициентом эффективности поиска блокирующих антител 34%). Функциональное ингибирование лектинового пути комплемента с помощью Fab2 обнаруживали по уровню отложения C4, который является прямым показателем расщепления C4 при воздействии MASP-2. Важно отметить, что ингибирование в равной мере подтверждалось и при оценке активности C3-конвертазы, что обосновывало функциональную блокаду лектинового пути комплемента. 17 Fab2, блокирующих MASP-2, идентифицированных, как описано в примере 10, эффективно ингибируют образование C3-конвертазы с величинами IC_{50} , равными или меньшими, чем 10 нмоль. Восемь из 17 идентифицированных Fab2 характеризуются величиной IC_{50} в субнанолярном диапазоне значений. Кроме того, все 17 Fab2, блокирующих MASP-2, демонстрировали практически полное ингибирование образования C3-конвертазы при исследовании лектинового пути C3-конвертазы, как показано на фиг. 8А-С и представлено в табл. 6 примера 10. Более того, каждый из 17 Fab2, блокирующих анти-MASP-2, приведенных в табл. 6, эффективно ингибирует генерацию C3b (>95%), демонстрируя, тем самым, специфичность этого анализа для лектинового пути C3-конвертазы.

Варианты крысиных IgG2c и мышиных IgG2a полноразмерных изотипов антител получали из Fab2 № 11. В этом примере описывается определение *in vivo* характеристик этих изотипов для фармакодинамических параметров.

Методы.

Как описано в примере 10, использовали белок крысиной MASP-2 для поиска Fab в фаговом дисплее библиотек антител, из которого был идентифицирован Fab2 № 11. Получали из Fab2 № 11 варианты крысиных IgG2c и мышиных IgG2a полноразмерных изотипов антител. Определяли характеристики крысиных IgG2c и мышиных IgG2a полноразмерных изотипов антител *in vivo* для фармакодинамических параметров, как описано далее.

Исследование *in vivo* на мышах.

Для изучения воздействия дозирования антитела против MASP-2 на активность лектинового пути в плазме *in vivo*, проводили фармакодинамическое исследование на мышах. В этом исследовании, измеряли отложение C4 *ex vivo* при анализе лектинового пути в разные моменты времени после подкожного (sc) и интраперитонеального (ip) введения 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2 (мышинового IgG2a полноразмерного изотипа антитела, полученного из Fab2 № 11).

На фиг. 21 графически изображен лектиновый путь специфичного отложения C4, измеренный *ex vivo* в неразбавленных образцах сыворотки, взятых у мышей (n=3 мыши/группа) в разные моменты времени после подкожного дозирования 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2. Образцы сыворотки мышей, собранные перед дозированием антитела, использовали в качестве отрицательного контроля (100% активность), а сыворотку, дополненную *in vitro* 100 нмоль того же блокирующего антитела против MASP-2, использовали в качестве положительного контроля (0% активность).

Результаты, приведенные на фиг. 21, демонстрируют быстрое и полное ингибирование отложения C4b после подкожного введения дозы 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2. Частичное ингибирование отложения C4 наблюдалось после подкожного введения дозы 0,3 мг/кг мышинового моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2.

Восстановление лектинового пути происходило в течение трех недель после однократного интраперитонеального введения мышинового моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2 мышам в дозе 0,6

мг/кг. Как показано на фиг. 22, резкое снижение активности лектинового пути происходило после дозирования антитела с последующим полным ингибированием лектинового пути, которое продолжалось приблизительно в течение 7 дней после интраперитонеального введения. Медленное восстановление активности лектинового пути наблюдалось в течение второй и третьей недели с полным восстановлением лектинового пути у мышей через 17 дней после введения мышинного моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2.

Эти результаты показывают, что мышинное моноклональное антитело (MoAb) против MASP-2, полученное из Fab2 № 11, ингибирует лектиновый путь мышей в зависимости от дозы при системном введении.

Пример 20.

В этом примере описывается анализ эффективности мышинного моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2, полученного из Fab2 № 11, на экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна на мышах.

Уровень изученности проблемы и актуальность.

Как описано в примере 10, использовали белок крысиной MASP-2 для поиска Fab в фаговом дисплее библиотек антител, из которого был идентифицирован Fab2 № 11 в качестве функционально активного антитела. Генерировали из Fab2 № 11 изотипы полноразмерных антител крысиного IgG2c и мышинного IgG2a. Определяли характеристики изотипа полноразмерного антитела против MASP-2 мышинного IgG2a для фармакодинамических параметров, как описано в Примере 19. В этом примере, исследовали полноразмерное антитело против мышинной MASP-2, полученное из Fab2 № 11, на экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна (AMD) на мышах, которая описана в публикации Bora P.S. et al., J Immunol 174:491-497 (2005).

Методы.

Изотип полноразмерного антитела мышинного IgG2a, полученный из Fab2 № 11, как описано в примере 19, исследовали на экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна (AMD) на мышах, как описано в примере 13, со следующими модификациями.

Введение моноклональных антител (MoAb) против мышинной MASP-2.

Две разные дозы (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг) моноклональных антител (MoAb) против мышинной MASP-2, наряду с обработкой моноклональным антителом (MoAb) для изотипического контроля, вводили интраперитонеально немутантным мышам (+/+) (n=8 мышей на группу) за 16 ч до индуцирования CNV.

Индукция неоваскуляризации хориоидеи (CNV).

Индукция неоваскуляризации хориоидеи (CNV) и измерение объема CNV проводили с использованием лазерной фотокоагуляции, как описано в примере 13.

Результаты.

На фиг. 23 графически представлена площадь CNV, измеренная через 7 дней после лазерного повреждения у мышей, обработанных моноклональным антителом (MoAb) для изотипического контроля или моноклональным антителом (MoAb) против мышинной MASP-2 (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг). Как показано на фиг. 23, у мышей, предварительно обработанных моноклональным антителом (MoAb) против MASP-2 с дозой 1,0 мг/кг, наблюдалось статистически значимое ($p < 0,01$) приблизительно 50% снижение CNV через семь дней после воздействия лазером. Как далее показано на фиг. 23, было обнаружено, что доза 0,3 мг/кг моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2 не оказывала эффективного воздействия на уменьшение CNV. Следует отметить, что было обнаружено, что доза 0,3 мг/кг моноклонального антитела (MoAb) против MASP-2 оказывает частичное и транзиторное ингибирующее действие в отношении отложения C4b после подкожного введения, как описано в примере 19 и показано на фиг. 21.

Результаты, описанные в этом примере, показывают, что блокада MASP-2 с помощью ингибитора, такого как моноклональное антитело (MoAb) против MASP-2, оказывает профилактическое и/или терапевтическое действие при лечении дегенерации желтого пятна. Следует отметить, что эти результаты согласуются с результатами, полученными в исследовании на MASP-2(-/-) мышах, описанном в примере 13, в котором через 7 дней после воздействия лазером наблюдали 30% снижение CNV у MASP-2(-/-) мышей по сравнению с контрольными немутантными мышами. Более того, результаты в этом примере дополнительно демонстрируют, что системная доставка антитела против MASP-2 обеспечивает местный положительный терапевтический эффект в глазу, подчеркивая тем самым эффективность системного способа введения при лечении пациентов с AMD. Таким образом, эти результаты являются доказательством возможности применения моноклональных антител (MoAb) против MASP-2 при лечении AMD.

Пример 21.

В этом примере показано, что MASP-2 дефицитные мыши после инфицирования менингококком защищены от вызываемой менингококком смертности и характеризуются повышенным клиренсом при бактериемии по сравнению с контрольными немутантными мышами.

Актуальность. Менингококк представляет собой гетеротрофную грамотрицательную диплококковую бактерию, известную своей ролью в возникновении менингита и других форм менингококковых заболеваний, таких как менингококкемия. Менингококк является основной причиной заболеваемости и смертности в детском возрасте. Серьезные осложнения включают септицемию, синдром Уотерхауса-

Фридериксена, недостаточность надпочечников и диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию (DIC). Смотрите, например, публикацию Rintala E. et al., *Critical Care Medicine* 28(7):2373-2378 (2000). В этом примере, исследовали роль лектинового пути на MASP-2(-/-) мышях и немутантных мышях (+/+), для того чтобы выяснить, подвержены ли MASP-2 дефицитные мыши летальным исходам, вызванным менингококком.

Методы.

Создавали MASP-2 нокаутных мышей, как описано в примере 1, и проводили их обратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с мышами линии C57B1/6. MASP-2 КО мышей (n=10) и немутантных мышей C57/B6 (n=10) в возрасте 10 недель инокулировали путем внутривенной инъекции с дозой 5×10^8 КОЕ/100 мкл, 2×10^8 КОЕ/100 мкл или 3×10^7 КОЕ/100 мкл менингококка серогруппы A Z2491 в 400 мг/кг декстрана железа. Постоянно наблюдали за выживаемостью мышей после инфицирования в течение 72 ч. У мышей брали образцы крови через один час после инфицирования и проводили анализ с целью определения уровня менингококка в сыворотки (log КОЕ/мл) для подтверждения инфицирования и определения скорости выведения бактерий из сыворотки.

Результаты.

На фиг. 24А графически представлен процент выживаемости MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после введения инфицирующей дозы менингококка 5×10^8 КОЕ/100 мкл. Как показано на фиг. 24А, после инфицирования с помощью самой высокой дозы менингококка 5×10^8 КОЕ/100 мкл, выживало 100% MASP-2 КО мышей в течение 72-часов после инфицирования. В отличие от этого, только 20% немутантных мышей оставались все живыми через 24 ч после инфицирования. Эти результаты показывают, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, связанного с инфицированием менингококком.

На фиг. 24В графически представлена величина log КОЕ/мл менингококка, определенная в различные моменты времени в образцах крови, взятых у MASP-2 КО мышей и немутантных мышей, инфицированных менингококком 5×10^8 КОЕ/100 мкл. Как показано на фиг. 24В, у немутантных мышей уровень менингококка в крови достигал максимального значения, равного приблизительно log КОЕ/мл 6,5 через 24 ч после инфицирования и снижался до нуля через 48 ч после инфицирования. В отличие от этого, у MASP-2 КО мышей уровень менингококка достиг максимального значения, равного приблизительно log КОЕ/мл 3,5 через 6 ч после инфицирования и снижался до нуля через 36 ч после инфицирования.

На фиг. 25А графически представлен процент выживаемости MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после инфицирования дозой менингококка 2×10^8 КОЕ/100 мкл. Как показано на фиг. 25А, после инфицирования дозой менингококка 2×10^8 КОЕ/100 мкл, выживало 100% MASP-2 КО мышей в течение 72 ч периода после инфицирования.

В отличие от этого, только 80% немутантных мышей оставались живыми через 24 ч после инфицирования. В соответствии с результатами, показанными на фиг. 24А, эти результаты дополнительно показывают, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, вызываемого менингококком.

На фиг. 25В графически представлена величина log КОЕ/мл менингококка, определенная в различные моменты времени в образцах крови, взятых у немутантных мышей, инфицированных менингококком 2×10^8 КОЕ/100 мкл. Как показано на фиг. 25В, уровень менингококка в крови немутантных мышей, инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл, достигал максимального значения, равного приблизительно log КОЕ/мл 4 через 12 ч после инфицирования, и снижался до нуля через 24 ч после инфицирования. На фиг. 25С графически представлена величина log КОЕ/мл менингококка, определенная в различные моменты времени в образцах крови, взятых у MASP-2 КО мышей, инфицированных менингококком 2×10^8 КОЕ/100 мкл. Как показано на фиг. 25С, уровень менингококка в крови MASP-2 КО мышей, инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл, достигал максимального значения, равного приблизительно log КОЕ/мл 3,5 через 2 ч после инфицирования, и снижался до нуля через 3 ч после инфицирования. В соответствии с результатами, показанными на фиг. 24В, эти результаты показывают, что, несмотря на то, что MASP-2 КО мышей инфицировали такой же дозой менингококка, как и немутантных мышей, MASP-2 КО мыши обладают повышенным клиренсом при бактериемии по сравнению с немутантными мышами.

Процент выживаемости MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после инфицирования самой низкой дозой менингококка 3×10^7 КОЕ/100 мкл составлял 100% в течение 72 ч после инфицирования (данные не показаны).

Обсуждение.

Эти результаты показывают, что с MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, связанного с менингококком, и обладают повышенным клиренсом при бактериемии по сравнению с немутантными мышами. Поэтому, принимая во внимание эти результаты, можно ожидать, что терапевтическое применение ингибиторов MASP-2, таких как моноклональное антитело MASP-2, будет эффективным при лечении, предотвращении или ослаблении инфицирования бактериями менингококка (то есть сепсиса и DIC). Кроме того, эти результаты показывают, что терапевтическое применение ингибиторов MASP-2, таких как моноклональное антитело MASP-2, не провоцирует у субъекта повышение риска заражения менингококком.

Пример 22.

В этом примере описывается открытие нового лектинового пути, опосредованного и MASP-2 зависимого альтернативного пути активации C4 компонента C3.

Актуальность.

Главный положительный терапевтический эффект использования ингибиторов активации комплемента для ограничения повреждения миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI) был убедительно продемонстрирован на экспериментальной модели инфаркта миокарда на крысах двадцать лет назад. Рекомбинантный sCR1, растворимое усеченное производное рецептора комплемента типа-1 клеточной поверхности (CR1), вводили внутривенно и оценивали его действие в экспериментальной модели MIRI на крысах. Лечение с помощью sCR1 уменьшало объем инфаркта более чем на 40% (Weisman, H.F., et al., *Science* 249:146-151 (1990)). Терапевтические возможности этого рекомбинантного ингибитора были затем продемонстрированы в клиническом испытании, которое показало, что введение sCR1 пациентам с МИ предотвращало недостаточность сократительной функции сердца после ишемии (Shandelya, S., et al., *Circulation* 87:536-546 (1993)). Однако, первичный механизм, приводящий к активации комплемента в ишемизированной ткани, окончательно выяснен не был, в основном, вследствие отсутствия соответствующих экспериментальных моделей, недостаточного понимания молекулярных процессов, которые приводили к активации комплемента обедненных кислородом клеток, и взаимного влияния и синергетических эффектов между различными путями активации комплемента.

В качестве основного компонента иммунного ответа, система комплемента обеспечивает защиту против поражающих микроорганизмов посредством как антителозависимых, так и независимых механизмов. Она управляет многими клеточными и гуморальными взаимодействиями в иммунном ответе, включающими хемотаксис, фагоцитоз, адгезию клеток и дифференцировку В-клеток. Три различных пути инициируют каскад реакций комплемента: классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь. Субкомпонент распознавания C1q классического пути связывается с целым рядом мишеней - наиболее важными иммунными комплексами - для инициирования поэтапной активации ассоциированных серин-протеаз, C1r и C1s, обеспечивая главный механизм выведения патогена и иммунного комплекса после начала действия адаптивной иммунной системы. Связывание C1q с иммунными комплексами превращает димер зимогена C1r в его активную форму для расщепления и, в силу этого, активации C1s. C1s транслирует C1q связывание в активацию комплемента посредством двух стадий расщепления: сначала происходит превращение C4 в C4a и C4b, и затем расщепление C4b-связанного C2 с образованием C3-конвертазы C4b2a. Этот комплекс превращает присутствующий в избытке в плазме компонент C3 в C3a и C3b. Аккумуляция C3b в непосредственной близости от комплекса C4b2a изменяет субстратную специфичность для C3 на C5 с образованием C5-конвертазы C4b2a(C3b)n. Комплексы C3- и C5-конвертазы, генерируемые в результате активации классического пути, идентичны комплексам, генерируемым в результате активации лектинового пути. В альтернативном пути, самопроизвольный незначительный гидролиз компонента C3 приводит к отложению фрагментов белка на поверхностях клеток, инициируя активацию комплемента на инородных клетках, в то время как связанные с клетками регуляторные белки на тканях организма-хозяина предотвращают активацию, тем самым предотвращая самоповреждение. Так же как в случае альтернативного пути, лектиновый путь может быть активирован в отсутствие иммунных комплексов. Активация инициируется путем связывания мультимолекулярного комплекса активации лектинового пути с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), в основном, с углеводными структурами, присутствующими на бактериальных, грибковых или вирусных патогенах, или с паттернами aberrантного гликозилирования на апоптотических, некротических, злокачественных или обедненных кислородом клетках (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., *N. Engl. J. Med.* 344:1058-1066 (2001); Schwaebler, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466 (2002); and Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353 (2002)).

Маннансвязывающий лектин (MBL) был первым субкомпонентом распознавания углеводов, относительно которого было показано, что он образует комплексы с группой новых серин-протеаз, названных MBL-ассоциированные серин-протеазы (MASP) и пронумерованных в соответствии с очередностью их открытия (то есть MASP-1, MASP-2 и MASP-3). У людей, комплексы активации лектинового пути могут образовываться с четырьмя субкомпонентами альтернативного распознавания углеводов с различной специфичностью при связывании углеводов, то есть с MBL 2, и с тремя различными представителями семейства фиколинов, а именно, L-фиколином, H-фиколином и M-фиколином, и MASP. Две формы MBL, MBL A и MBL C, и фиколин-A образуют комплексы активации лектинового пути с MASP в плазме мышей и крыс. Авторами изобретения ранее были клонированы и охарактеризованы MASP-2 и дополнительный продукт усеченного гена MASP-2 с массой 19 кДа, обозначаемый как MAP19 или sMAP, у людей, мышей и крыс (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510 (1997); Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 162:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863 (1999); and Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 163:6848-6859 (1999)). MAP19/sMAP лишен протеазной активности, но может регулировать активацию лектинового пути путем конкуренции с комплексами распознавания углеводов за связывание MASP (Iwaki, D. et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632 (2006)).

Существует доказательство, которое подтверждает, что из трех MASP, только MASP-2 необходима

для трансляции связывания комплексов распознавания лектинового пути в активацию комплемента (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., *J. Immunol.* 165:878-887 (2000); Rossi, V., et al., *J. Biol. Chem.* 276:40880-40887 (2001)). Этот вывод подтверждается фенотипом совсем недавно описанного штамма мышей, дефицитных по MASP-1 и MASP-3. Если не принимать во внимание отсрочку начала лектинового пути, опосредованного активацией комплемента *in vitro*, то -MASP-1/3 дефицитные мыши сохраняют функциональную активность лектинового пути. Реконструкция MASP-1 и MASP-3 дефицитной сыворотки с помощью рекомбинантной MASP-1 позволяет преодолеть эту отсрочку при активации лектинового пути, косвенно указывая на то, что MASP-1 может способствовать MASP-2 активации (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)). В самом последнем исследовании было показано, что MASP-1 (и также возможно MASP-3) необходимы для превращения ферментного фактора D активации альтернативного пути из его зимогенной формы в его ферментативно активную форму (Takahashi, M., et al., *J. Exp. Med.* 207:29-37 (2010)). Физиологическую значимость этого процесса подтверждает отсутствие функциональной активности альтернативного пути в плазме MASP-1/3 дефицитных мышей.

Недавно генерированные штаммы мышей с комбинированными таргетными дефицитами субкомпонентов распознавания углеводов лектинового пути MBL A и MBL C все еще способны инициировать активацию лектинового пути за счет оставшегося мышинового субкомпонента распознавания фиколина A лектинового пути (Takahashi, K., et al., *Microbes Infect.* 4:773-784 (2002)). Отсутствие какой-либо остаточной функциональной активности лектинового пути у MASP-2 дефицитных мышей позволяет создать обоснованную модель для исследования роли этой эффекторной группы врожденного гуморального иммунитета в норме и при патологии.

Доступность C4 и MASP-2 дефицитных штаммов мышей дает возможность определения нового лектинового пути, специфичного, но MASP-2 зависимого альтернативного пути активации C4 комплемента C3. Важнейший вклад этого нового лектинового пути, опосредованного альтернативным путем активации C4, в потерю ткани после ишемии подтверждается ярко выраженным защитным фенотипом MASP-2 дефицита при повреждении миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI), в то время как у C4-дефицитных мышей, испытываемых в этой же модели, не обнаруживали эту защиту.

В этом примере, описывается новый лектиновый путь, опосредованный и MASP-2 зависимый альтернативный путь активации C4 комплемента C3. Физиологическая значимость этого нового пути активации установлена на основании защитного фенотипа MASP-2 дефицита в экспериментальной модели повреждения миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI), в которой C4-дефицитные животные не были защищены.

Методы.

У MASP-2 дефицитных мышей не обнаруживаются тяжелые формы нарушений. MASP-2 дефицитных мышей создавали, как описано в примере 1. Как гетерозиготные (+/-), так и гомозиготный (-/-) MASP-2 дефицитные мыши являются здоровыми и фертильными, и они не обнаруживают тяжелых форм нарушений. Их средняя продолжительность жизни аналогична средней продолжительности жизни их однопометных немутантных мышей (>18 месяцев). Перед исследованием фенотипа этих мышей в экспериментальных моделях заболевания, мышей линии MASP-2-/- подвергали возвратному скрещиванию на протяжении одиннадцати поколений с мышами линии C57BL/6. Полное отсутствие мРНК MASP-2 подтверждали методом нозерн-блоттинга препаратов поли (A+) выбранных РНК печени, при этом 1,2 kb (тысяча пар нуклеидов) мРНК, кодирующая Map19 или sMAP (усеченный продукт альтернативного сплайсинга гена MASP-2), экспрессируется в избытке.

Анализ методом количественной полимеразной цепной реакции в масштабе реального времени (qRT-PCR) с использованием пары праймеров, специфичных в отношении или кодирующей последовательности для домена серин-протеазы MASP-2 (В цепь), или остатка кодирующей последовательности для А-цепи, показал, что В цепь, кодирующая мРНК, не обнаруживается у MASP-2-/- мышей, при этом избыток разорванной А-цепи мРНК-транскрипта значительно увеличивался. Аналогичным образом, избыток Map19/sMAP, кодирующего мРНК, увеличивается у MASP-2+/- мышей и MASP-2-/- мышей. Уровни MASP-2 в плазме, определенные методом ELISA для 5 животных каждого генотипа, составляли 300 нг/мл для контрольных немутантных мышей (диапазон 260-330 нг/мл), 360 нг/мл для гетерозиготных мышей (диапазон 330-395 нг/мл) и не обнаруживались у MASP-2-/- мышей. Используя qRT-PCR, определяли профили экспрессии мРНК, которые показывали, что MASP-2-/- мыши экспрессируют мРНК для MBL A, MBL C, фиколина А, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, фактора В, фактора D, C4 и C3 в избытке, аналогичном избытку в случае MASP-2 достаточных однопометных мышей (данные не показаны).

Измеряли уровни C3 в плазме MASP-2-/- (n=8) и MASP-2+/+ (n=7) однопометных мышей, используя коммерчески доступный набор mouse C3 ELISA (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA). Уровни C3 MASP-2 дефицитных мышей (среднее значение 0,84 мг/мл + 0,34) были аналогичны уровням контрольных немутантных мышей (среднее значение 0,92±0,37).

Результаты.

MASP-2 имеет важное значение для функциональной активности лектинового пути.

Как описано в примере 2 и показано на фиг. 5, *in vitro* анализы MASP-2^{-/-} в плазме показали полное отсутствие функциональной активности лектинового пути на активированных покрытых маннаном и зимозаном поверхностях для активации C4. Аналогичным образом, не обнаруживали ни зависимый от лектинового пути C4, ни расщепление C3, в MASP-2^{-/-} плазмы на поверхностях, покрытых N-ацетилглюкозаминном, который связывает и инициирует активацию через посредство MBL A, MBL C и фиколина A (данные не показаны).

Анализы сыворотки и плазмы MASP-2^{-/-} мышей однозначно показывали, что MASP-2 существенно необходима для активации комплемента по лектинному пути. Однако общий дефицит функциональной активности лектинового пути не затрагивает активацию комплемента по другим путям. MASP-2^{-/-} плазма может все же активировать комплемент по классическому (фиг. 26A) и по альтернативному пути (фиг. 26B). На фиг. 26A и 26B, символ "*" обозначает сыворотку немутантных мышей (MASP-2 (+/+)); символ "●" обозначает сыворотку немутантных мышей (истощенных по C1q); символ "□" обозначает сыворотку MASP-2 (-/-) мышей; и символ "Δ" обозначает сыворотку MASP-2 (-/-) мышей (истощенных по C1q).

На фиг. 26A графически показано, что у MASP-2^{-/-} мышей сохраняется функциональный классический путь. Отложение C3b изучали на титрационных микропланшетах, с нанесенными иммунными комплексами (генерируемыми *in situ* путем нанесения BSA, затем добавления козьего IgG против BSA). На фиг. 26B графически показано, что у MASP-2 дефицитных мышей сохраняется функциональный альтернативный путь. Отложение C3b изучали на титрационных микропланшетах с нанесенным зимозаном в условиях, которые делают возможным только активацию альтернативного пути (буфер, содержащий Mg²⁺ и EGTA). Результаты, показанные на фиг. 26A и фиг. 26B, являются средними величинами двух измерений и обычно получены в трех независимых экспериментах. На всех фигурах использовали одни и те же символы для обозначения данных для плазмы. Эти результаты показывают, что у MASP-2 дефицитных мышей присутствует функциональный альтернативный путь, о чем свидетельствуют результаты, показанные на фиг. 26B, при экспериментальных условиях, предназначенных для непосредственного инициирования альтернативного пути, при инактивации как классического пути, так и лектинового пути.

Лектиновый путь активации комплемента в высокой степени способствует потере ткани при воспалении при повреждении миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI).

Для исследования вклада функциональной активности лектинового пути в повреждение миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI), проводили сравнение MASP-2^{-/-} мышей и контрольных однопометных немутантных мышей в экспериментальной модели MIRI после транзистентного лигирования и реперфузии левой передней нисходящей ветви коронарной артерии (LAD). Присутствие или отсутствие комплемента C4 не отражается на степени потери ишемизированной ткани при MIRI. Проводили оценку влияния дефицита C4 на размеры инфаркта после экспериментального повреждения миокарда в результате ишемии/реперфузии (MIRI). Как показано на фиг. 27A и фиг. 27B, идентичные размеры инфаркта обнаруживали как у C4-дефицитных мышей, так и у однопометных немутантных мышей. На фиг. 27A графически представлены данные по MIRI-индуцированной потере ткани после лигирования и реперфузии LAD у C4^{-/-} мышей (n=6) и у соответствующим им контрольных однопометных немутантных мышей (n=7). На фиг. 27B графически представлена зависимость площади инфаркта (INF) от площади в зоне риска (AAR), четко демонстрирующая, что C4^{-/-} мыши также подвержены MIRI, как и их контрольные немутантные мыши (пунктирная линия).

Эти результаты показывают, что C4 дефицитные мыши не защищены от MIRI. Такой результат был неожиданным, так как он противоречит широко принятой точке зрения, что главный фрагмент активации C4, C4b, является необходимым компонентом классического и лектинового пути C3-конвертазы C4b2a. Поэтому, исследовали возможность обнаружения остаточной специфической активации комплемента C3 по лектинному пути в плазме C4-дефицитной мыши человека.

Лектиновый путь может активировать комплемент C3 в отсутствие C4 посредством нового MASP-2 зависимого альтернативного пути активации C4.

Основываясь на результатах научных исследований прошлых лет, которые указывают на существование альтернативной активации C4 в сыворотке C4-дефицитных морских свинок (May, J.E., and M. Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973)), проводили исследование наличия у C4-дефицитных мышей остаточной функциональной активности классического или лектинового пути и постоянно регистрировали активацию C3 при специфичных к пути активации условиях исследования, которые исключают вклад альтернативного пути.

Отложение C3b исследовали на титрационных микропланшетах с нанесенным маннаном, используя декальцифицированную плазму при концентрациях плазмы, препятствующих альтернативному пути активации (1,25% и ниже). Несмотря на то что расщепление C3 не обнаруживалось в C4-дефицитной плазме, подвергавшейся испытанию на активацию классического пути (данные не показаны), тем не менее, наблюдалась сильная остаточная активность расщепления C3 в плазме C4-дефицитных мышей при инициировании активации комплемента по лектинному пути. Зависимость от лектинового пути демонстрируется путем конкурирующего ингибирования расщепления C3 после предварительной инкубации разбавлений C4-дефицитной плазмы с растворимым маннаном (см. фиг. 28A). Как показано на фиг. 28A-D,

обнаруживали MASP-2 зависимую активацию C3 в отсутствии C4. На фиг. 28А графически представлено отложение C3b под воздействием C4+/+ (крестики) и C4-/- (незакрашенные кружки) мышинной плазмы. Предварительное инкубирование C4-/- плазмы с избытком (1 мкг/мл) маннана в жидкой фазе перед исследованием приводило к полному ингибированию отложения C3 (закрашенные кружки). Результаты получены в трех независимых экспериментах. На фиг. 28В графически представлены результаты эксперимента, в котором плазму (1%) немутантных, MASP-2 дефицитных (незакрашенные квадраты) и C4-/- мышей смешивали с различными концентрациями mAbM11 против крысиной MASP-2 (ось абсцисс), и исследовали отложение C3b на планшетах с нанесенным маннаном. Результаты представляют собой средние значения ($\pm$ SD) 4 исследований (два параллельных эксперимента для 2 из каждого типа плазмы). На фиг. 28С графически представлены результаты эксперимента, в котором плазму человека, объединенную с NHS (крестики), C4-/- плазму (незакрашенные кружки) и C4-/- плазму предварительно инкубировали с 1 мкг/мл маннана (закрашенные кружки). Результаты представляют три независимых эксперимента. На фиг. 28D графически показано, что ингибирование отложения C3b в C4 достаточной и C4 дефицитной плазмы человека (1%) с помощью mAbH3 против человеческой MASP-2 (средние значения $\pm$ SD трех параллельных экспериментов). Как показано на фиг. 28В, не обнаруживали зависимую от лектинового пути активацию C3 в MASP-2-/- плазме, анализируемой параллельно, что означает, что эта C4-альтернативная активация C3 является MASP-2 зависимой.

Для дополнительного подтверждения этих выводов, был создан ряд рекомбинантных ингибирующих моноклональных тел (mAbs), выделенных из фагового дисплея библиотек антител путем скрининга аффинности в отношении рекомбинантной человеческой и крысиной MASP-2A (где сериновый остаток активного домена протеазы заменяли на аланиновый остаток путем сайт-направленного мутагенеза для предотвращения аутолитической деградации антигена). Рекомбинантные антитела против MASP-2 (AbH3 и AbM11) выделяли из комбинаторных библиотек антител (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)), используя рекомбинантное человеческую и крысиную MASP-2A в качестве антигенов (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). Антикрысиный фрагмент Fab2, который эффективно ингибировал опосредованную лектиновым путем активации C4 и C3 в мышинной плазме ($IC_{50} \sim 1$ нМ) превращали в полноразмерное IgG2a антитело. Поликлональную антисыворотку против мышинной MASP-2A индуцировали в крысах. Эти инструменты позволяли подтвердить MASP-2 зависимость этого нового лектинового пути, специфичного к C4-альтернативному пути активации C3, дополнительно описанному ниже.

Как показано на фиг. 28В, M211, ингибирующее моноклональное антитело, которое селективно связывается с мышинной и крысиной MASP-2, ингибировало C4-альтернативную активацию C3 у C4-дефицитных мышей, а также активацию C3 в плазме немутантных мышей по лектиновому пути, в зависимости от концентрации с аналогичными величинами IC_{50} . Все исследования проводили при высоких разбавлениях плазмы, делая альтернативный путь активации дисфункциональным (при этом самая высокая концентрация плазмы составляла 1,25%).

Для исследования присутствия аналогичного лектинового пути, специфического к C4-альтернативной активации C3 у человека, была проанализирована плазма донора с врожденным дефицитом обоих генов человеческого C4 (то есть C4A и C4B), приводящим к полному отсутствию C4 (Yang, Y., et al., J. Immunol. 173:2803-2814 (2004)). На фиг. 28С показано, что плазма этого пациента эффективно активировала C3 в высоких разбавлениях плазмы (делая альтернативный путь активации дисфункциональным). Особый метод активации C3 по лектиновому пути на планшетах с нанесенным маннаном продемонстрирован в C4-дефицитной плазме мышей (фиг. 28А) и в C4-дефицитной плазме человека (фиг. 28С) путем добавления избыточных концентраций маннана в жидкой фазе. MASP-2 зависимость механизма этой активации C3 в C4-дефицитной плазме человека оценивали с помощью AbH3, моноклонального антитела, которое специфически связывает человеческую MASP-2 и подавляет MASP-2 функциональную активность. Как показано на фиг. 28D, AbH3 ингибировало отложение C3b (и C3dg) как C4-достаточной, так и в C4-дефицитной плазме человека с соизмеримой активностью.

Для оценки возможной роли других компонентов комплемента в C4-альтернативной активации C3, проводили испытание плазмы MASP-1/3-/- и Bf/C2-/- мышей, наряду с MASP-2-/-, C4-/- и C1q-/- плазмой (в качестве контроля) при специфических условиях исследования как для лектинового пути, так и для классического пути. Строили графическую зависимость относительной величины расщепления C3 от количества отложения C3 при использовании плазмы немутантных мышей.

На фиг. 29А графически представлен сравнительный анализ активности C3-конвертазы в плазме различных штаммов комплемент дефицитных мышей, подвергавшейся испытаниям при специфических условиях исследования как для лектинового пути, так и для классического пути. Образцы разбавленной плазмы (1%) немутантных мышей (n=6), MASP-2-/- мышей (n=4), MASP-1/3-/- мышей (n=2), C4-/- мышей (n=8), C4/MASP-1/3-/- мышей (n=8), Bf/C2-/- (n=2) и C1q-/- мышей (n=2) подвергали испытаниям параллельно. Реконструкция Bf/C2-/- плазмы с помощью 2,5 мкг/мл рекомбинантного C2 крысы (Bf/C2-/- +C2) восстанавливала отложение C3b. Результаты представляют собой средние значения ($\pm$ SD), **p < 0,01 (по сравнению с плазмой немутантных мышей). Как показано на фиг. 29А, наблюдается сущест-

венное отложение C3 в C4-/- плазме, испытываемой при специфических условиях исследования для лектинового пути, но при специфических условиях исследования для классического пути. И в этом случае, не наблюдали отложения C3 в MASP-2 дефицитной плазме в результате активации лектинового пути, в то время как в этой же плазме происходило отложение C3 по классическому пути. В MASP-1/3-/- плазме, отложение C3 происходит как при специфических условиях исследования лектинового пути, так и при специфических условиях исследования классического пути. Не обнаруживалось отложение C3 в плазме с дефицитом C4 и MASP-1/3, как при использовании специфических условий исследования лектинового пути, так и при использовании специфических условий исследования классического пути. Не обнаруживается отложение C3 в C2/Bf-/- плазме, как по лектинному пути, так и по классическому пути. Однако, реконструкция плазмы C2/Bf-/- мышей с помощью рекомбинантного C2, восстанавливала расщепление C3, опосредованное как лектиновым путем, так и классическим путем. Условия исследования валидизировали, используя C1q-/- плазму.

На фиг. 29B графически представлены данные кинетического исследования с разрешением по времени активности C3-конвертазы в плазме различных штаммов комплемент дефицитных немутантных, fB-/-, C4-/-, MASP-1/3-/- и MASP-2-/- мышей, испытываемой при специфических условиях исследования активации лектинового пути (1% плазма, результаты обычно получают в трех независимых экспериментах). Как показано на фиг. 29B, в то время как расщепление C3 в плазме MASP-2-/- не обнаруживалось, fB-/- плазма расщепляла C3 с кинетикой, аналогичной кинетике в случае плазмы немутантных мышей. Значительная отсрочка в зависимом от лектинового пути превращении C3 в C3b (и C3dg) наблюдали в C4-/- плазме, а также в MASP-1/3 дефицитной плазме. Недавно было показано, что эта отсрочка активации C3 в MASP-1/3-/- плазме должна быть MASP-1 зависимой, а не MASP-3 зависимой (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)).

Обсуждение.

Результаты, описанные в этом примере, дают веские основания предполагать, что функциональная активность MASP-2 является необходимой для активации C3 по лектинному пути как в присутствии, так и в отсутствии C4. Кроме того, C2 и MASP-1 являются необходимыми для того, чтобы функционировал этот новый специфичный к лектинному пути C4-альтернативный путь активации C3. Сравнительный анализ функциональной активности лектинового пути в MASP-2-/- плазме, а также в C4-/- плазме, выявил существование ранее нераспознанного C4-независимого, но MASP-2-зависимого пути активации комплемента C3, и показал, что C3 может быть активирован зависимым от лектинового пути способом при полном отсутствии C4. Несмотря на то что детальные молекулярные композиции и последовательность событий активации этой новой MASP-2 зависимой C3-конвертазы остаются невыясненными, представленные результаты означают, что эта C4-альтернативная активация требует присутствия компонента C2, а также MASP-1. Потеря активации расщепления C3, опосредованной лектиновым путем, в плазме мышей с комбинированным C4 и MASP-1/3 дефицитом может быть объяснена совсем недавно описанной ролью MASP-1 в усилении MASP-2 зависимой активации комплемента путем прямого расщепления и активация MASP-2 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)). Подобным образом, MASP-1 может усиливать функциональную активность MASP-2, благодаря ее способности расщеплять C2 (Moller-Kristensen, et al., *Int. Immunol.* 19:141-149 (2007)). Обе эти активности могут быть объяснены пониженной скоростью, с которой MASP-1/3 дефицитная плазма расщепляет C3 через активацию по лектинному пути, и тем, что для поддержания превращения C3 по C4-альтернативному пути активация может требоваться MASP-1.

Было показано, что неспособность C2/fB-/- плазмы активировать C3 по лектинному пути является C2-зависимой, так как добавление рекомбинантного крысиного C2 к C2/fB-/- плазме восстанавливало способность реконструированной плазмы активировать C3 на планшетах с нанесенным маннаном.

Вывод о том, что дефицит C4 специфически разрушает классический путь активации комплемента, в то время как лектиновый путь поддерживает физиологически очень важный уровень активности C3-конвертазы через MASP-2 зависимый C4-альтернативный путь активации, требует переоценки роли лектинового пути в различных экспериментальных моделях заболеваний, включая экспериментальную модель пневмококковой инфекции (Brown, J.S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16969-16974 (2002)); Experimental Allergic Encephalomyelitis (Boos, L.A., et al., *Glia* 49:158-160 (2005); и модели C3 зависимой регенерации печени на мышах (Clark, A., et al., *Mol. Immunol.* 45:3125-3132 (2008)). Упомянутая последней группа показала, что C4-дефицитные мыши могут независимым способом активировать C3 по альтернативному пути, так как *in vivo* ингибирование альтернативного пути в результате опосредованного антителом истощения функциональной активности фактора В не оказывало действие на зависимую от расщепления C3 регенерацию печени у C4-/- мышей (Clark, A., et al. (2008)). Этот опосредованный с помощью лектинового пути C4-альтернативный путь активации C3 может также объяснять потерю защитного фенотипа C4 дефицита в модели MIRI, а также в ранее описанной модели отторжения аллотрансплантата почки (Lin, T., et al., *Am. J. Pathol.* 168:1241-1248 (2006)). В отличие от этого, недавно полученные результаты независимо продемонстрировали важный защитный фенотип MASP-2-/- мышей в моделях трансплантации почки (Farrar, C.A., et al., *Mol. Immunol.* 46:2832 (2009)).

Таким образом, результаты этого примера подтверждают точку зрения, что MASP-2 зависимая C4-

альтернативная активация C3 является физиологически релевантным механизмом, который может играть важную роль в условиях, когда доступность C4 лимитируется активацией C3.

Пример 23.

В этом примере описывается активация C3 тромбиновыми субстратами и отложение C3 на маннанах у немутантных (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) и C4 (-/-) мышей.

Актуальность.

Как описано в примере 14, было обнаружено, что активация тромбином может возникать после активации лектинового пути при физиологических условиях, и она характеризует степень вовлечения MASP-2 в патологический процесс. C3 играет центральную роль в активации системы комплемента. C3 активация необходима для активации комплемента как по классическому, так и по альтернативному пути. Эксперимент проводили с целью выяснения, активируется ли C3 тромбиновыми субстратами.

Методы.

Активация C3 тромбиновыми субстратами.

Активацию C3 измеряли в присутствии следующих активированных форм тромбиновых субстратов: человеческий FCXIa, человеческий FVIIa, бычий FXa, человеческий FXa, человеческий активированный белок C, и человеческий тромбин. C3 инкубировали с различными тромбиновыми субстратами, затем разделяли в восстановительных условиях на полиакриламидных гелях в присутствии 10% додецилсульфата натрия. После электрофоретического переноса с использованием целлюлозной мембраны, мембрану инкубировали с крысиным моноклональным биотин-связанным антителом против мышинового C3, определяемым с помощью набора стрептавидин-пероксидаза хрена, и проявляли, используя реагент энтерохромаффин (ECL).

Результаты.

Активация C3 включает расщепления интактной α -цепи на усеченную α' цепь и растворимый C3a (не показано на фиг. 30). На фиг. 30 представлены результаты анализа методом вестерн-блоттинга активации человеческого C3 тромбиновыми субстратами, где нерасщепленная альфа цепь C3 и продукт активации α' цепь изображены стрелками. Как показано на фиг. 30, инкубирование C3 с активированными формами человеческого фактора свертывания крови XI и фактора X, а также с активированным бычьим фактором свертывания X, может расщеплять C3 *in vitro* в отсутствие каких-либо протеаз комплемента.

Отложение C3 на маннанах.

Исследования отложения C3 проводили на образцах сыворотки, полученной от немутантных, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) и C4(-/-) мышей. F11 является геном, кодирующим коагуляцию фактора XI. Для измерения C3 активации, на титрационные микропланшеты наносили слой маннана (1 мкг/лунка), затем добавляли овечью антисыворотку против HSA (2 мкг/мл) в TBS/tween/Ca²⁺. Планшеты блокировали с помощью 0,1% HSA в TBS и промывали, как описано выше. Образцы плазмы разбавляли в 4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, pH 7,4, добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. После промывки, определяли связанный C3b, используя кроличье антитело против человеческого C3c (Dako), затем конъюгированное с щелочной фосфатазой козье антитело против кроличьего IgG и pNPP.

Результаты.

На фиг. 31 приведены результаты исследования отложения C3 на образцах сыворотки, полученной от немутантных, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) и C4 (-/-) мышей. Как показано на фиг. 31, функциональный лектиновый путь существует даже при полном отсутствии C4. Как далее показано на фиг. 31, для этой активации комплемента, зависимой от нового лектинового пути, требуется фактор коагуляции XI.

Обсуждение.

До того, как были получены результаты в этом эксперименте, специалисты в этой области считали, что для активации C4 требуется лектиновый путь активации комплемента. Вследствие этого, данные, полученные на C4 нокаутных мышах (и на C4 дефицитных людях), интерпретировали с предположением, что такие организмы являются дефицитными по лектиновому пути (помимо дефицита классического пути). Настоящие результаты показывают, что это мнение является ошибочным. Так, например, могут быть ошибочными выводы прошлых исследований, предполагающие, что лектиновый путь не является важным в случаях конкретных заболеваний, основанных на фенотипе C4 дефицитных животных. Описанные в этом примере данные также показывают, что в физиологическом контексте цельной сыворотки, лектиновый путь может активировать компоненты системы коагуляции. Таким образом, показано, что существует взаимосвязь между комплементом и коагуляцией с участием MASP-2.

Пример 24.

В этом примере описываются методы оценки воздействия антитела против MASP-2 на лизис эритроцитов в образцах крови пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией (PNH).

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), также называемая синдромом Маркиафавы-Микели, представляет собой приобретенное потенциально опасное для жизни заболевание крови, характеризующееся комплемент-индуцированной внутрисосудистой гемолитической анемией. Отличитель-

ным признаком PNH является хронический внутрисосудистый гемолиз, который является следствием неконтролируемой активации комплемента по альтернативному пути (Lindorfer, M.A., et al., Blood 115 (11) (2010)). Анемия при PNH обусловлена разрушением эритроцитов в кровотоке. Симптомы PNH включают красную мочу вследствие появления гемоглобина в моче и тромбоз. PNH может развиваться сама по себе, в этом случае ее называют "первичной PNH", или может быть связана с другими расстройствами костного мозга, такими как апластическая анемия, и в этом случае ее называют "вторичной PNH". Лечение PNH включает переливание крови в случае анемии, антикоагуляция в случае тромбоза и применение моноклонального антитела экулизумаба (Soliris), которое защищает клетки от иммунного повреждения путем ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). Однако, у значительной части пациентов с PNH, подвергнутых лечению экулизумабом, остаются клинические проявления иммунно-опосредованной гемолитической анемии, так как антитело не блокирует активацию комплемента по альтернативному пути.

В этом примере описываются методы оценки воздействия антитела против MASP-2 на лизис эритроцитов в образцах крови пациентов с PNH (не подвергавшихся лечению с помощью Soliris), где эритроциты инкубируют с совпадающей по группе крови подкисленной сывороткой здорового человека. Методы. Реагенты. Эритроциты здоровых доноров и пациентов, страдающих от PNH (не подвергавшихся лечению с помощью Soliris), получают путем венопункции и приготавливают, как описано в публикации Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Антитела против MASP-2 с функциональной блокирующей активностью в отношении лектинового пути могут быть продуцированы, как описано в примере 10.

Анализ гемолиза.

Определения способности антител против MASP-2 блокировать гемолиз эритроцитов у пациентов с PNH проводят, используя методы, описанные в публикациях Lindorfer, M.A., et al., Blood 15 (11):2283-91 (2010) и Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылки на них. Как описано в публикации Lindorfer et al., эритроциты пациентов с PNH центрифугируют, лейкоцитарную пленку аспирируют, и клетки промывают в желатин-вероналовом буфере (GVB) перед каждым экспериментом. Эритроциты испытывают на восприимчивость к APC-опосредованному лизису следующим образом. Совпадающую по группе крови сыворотку здорового человека разбавляют с помощью GVB, содержащего 0,15 mM CaCl₂ и 0,5 mM MgCl₂ (GVB⁺), и подкисляют до pH 6,4 (подкисленная NHS, aNHS) и используют для восстановления эритроцитов до гематокрита 1,6% в 50% aNHS. Затем смеси инкубируют при 37°C, и через 1 час, эритроциты осаждают центрифугированием. Измеряют при 405 нм оптическую плотность аликвоты извлеченной надосадочной жидкости и используют эти данные для расчета процента лизиса. Образцы, восстановленные в подкисленной смеси сыворотка-EDTA, подвергают аналогичной обработке и используют для определения сопутствующего не опосредованного комплементом лизиса (обычно менее 3%). Полный лизис (100%) определяют после инкубирования эритроцитов в дистиллированной воде.

Для определения воздействия антител против MASP-2 на гемолиз эритроцитов при PNH, эритроциты пациентов с PNH инкубируют в aNHS в присутствии постепенно возрастающих концентраций антител против MASP-2, и затем количественно определяют присутствие/величину гемолиза.

Принимая во внимание тот факт, что было обнаружено, что антитела против MASP-2 блокируют последующую активацию комплемента по альтернативному пути, предполагается, что антитела против MASP-2 могут эффективно блокировать гемолиз эритроцитов при PNH, опосредованный альтернативным путем, и могут применяться в качестве терапевтического средства для лечения пациентов, страдающих от PNH.

Пример 25.

В этом примере описывается методы оценки воздействия блокирующего антитела против MASP-2 на активацию комплемента криоглобулинами в образцах крови пациентов, страдающих от криоглобулинемии.

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Криоглобулинемия характеризуется присутствием криоглобулинов в сыворотке. Криоглобулины представляют собой индивидуальные или смешанные иммуноглобулины (обычно IgM антитела), которые подвержены обратимой агрегации при низких температурах. Агрегация приводит к активации классического пути комплемента и воспалению в сети сосудов, в частности, на периферии. Клинические проявления криоглобулинемии включают васкулиты и гломерулонефрит.

Криоглобулинемия может быть классифицирована на основе композиции криоглобулина следующим образом:

криоглобулинемия типа I, или простая криоглобулинемия, обусловлена моноклональным иммуноглобулином, обычно иммуноглобулином M (IgM);

криоглобулинемия типа II и типа III (смешанная криоглобулинемия) содержит ревматоидные факторы (RF), которые представляют собой обычно IgM в комплексах с Fc частью поликлонального IgG.

Состояния, связанные с криоглобулинемией, включают инфицирование вирусом гепатита C, лимфопролиферативные расстройства и другие аутоиммунные заболевания. Криоглобулин-содержащие им-

мунные комплексы вызывают клинический синдром системного воспаления, по-видимому, вследствие их способности активировать комплемент. Несмотря на то что в норме IgG иммунные комплексы активируют классический путь комплемента, тем не менее, IgM содержащие комплексы могут также активировать комплемент по лектиновому пути (Zhang, M., et al., *Mol Immunol* 44(1-3):103-110 (2007) and Zhang, M., et al., *J. Immunol.* 177(7):4727-34 (2006)).

Иммуногистохимические исследования дополнительно продемонстрировали, что иммунные комплексы криоглобулина содержат компоненты лектинового пути, и биоптаты пациентов с криоглобулинемическим гломерулонефритом представили иммуногистохимическое доказательство активации лектинового пути *in situ* (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol* 101(1):59-66 (2001)). Эти результаты позволяют предположить, что лектиновый путь может способствовать воспалению и неблагоприятным исходам при криоглобулинемических заболеваниях.

Методы.

Определение способности антител против MASP-2 блокировать негативные последствия криоглобулинемии проводят с использованием исследования превращения C3 в жидкой фазе, как описано в публикации Ng Y.C. et al., *Arthritis and Rheumatism* 31(1):99-107 (1988), содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Как описано в публикации Ng et al., при эссенциальной криоглобулинемии смешанного типа (EMC), моноклональный ревматоидный фактор (mRF), обычно IgM, комплексуется поликлональный IgG с образованием характерного криопреципитата иммунных комплексов (IC) (криоглобулин типа II). Иммуноглобулины и C3 были обнаружены на стенках сосудов в пораженных тканях, таких как кожа, нервное волокно и ткани почек. Как описано в публикации Ng et al., ¹²⁵I-меченый mRF добавляют к сыворотке (к сыворотке здорового человека и к сыворотке пациентов, страдающих от криоглобулинемии), инкубируют при 37°C и измеряют связывание с эритроцитами.

Определяют превращение C3 в жидкой фазе в сыворотке крови (к сыворотке здорового человека и к сыворотке пациентов, страдающих от криоглобулинемии) в присутствии или отсутствии следующих криопреципитатов иммунных комплексов (IC): BSA-анти BSA, mRF, mRF плюс IgG или криоглобулины, в присутствии или отсутствии антител против MASP-2. Измеряют фиксацию C3 и C4 с криопреципитатом иммунных комплексов, используя исследование соосаждения с F(ab')₂ анти-C3 и F(ab')₂ анти-C4.

Принимая во внимание тот факт, что было показано, что антитела против MASP-2 блокируют активацию лектинового пути, предполагается, что антитела против MASP-2 могут эффективно блокировать опосредованные комплементом негативные последствия, связанные с криоглобулинемией, и могут применяться в качестве терапевтического средства для лечения пациентов, страдающих от криоглобулинемии.

Пример 26.

В этом примере описывается методы для оценки воздействия антитела против MASP-2 на образцы крови пациентов с болезнью Холодовых агглютининов, которая проявляется в форме анемии.

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Болезнь холодовых агглютининов (CAD) является типом аутоиммунной гемолитической анемии. Антитела холодовых агглютининов (обычно IgM) активируют при низких температурах и связывают и агрегируют с эритроцитами. Антитела холодовых агглютининов связывают с комплементом и воздействуют на антиген на поверхности эритроцитов. Это приводит к опсонизации эритроцитов (к гемолизу), которая инициирует их выведение by the ретикулоэндотелиальной системой. Температура, при которой происходит агглютинация, варьирует от пациента к пациенту.

CAD проявляется в форме анемии. Анемия возникает тогда, когда скорость разрушения эритроцитов превышает способность костного мозга продуцировать адекватное количество несущих кислород клеток. CAD может быть вызвана основным заболеванием или расстройством (в этом случае ее называют "вторичной CAD"), таким как инфекционное заболевание (микоплазма пневмонии, инфекционный паротит, мононуклеоз), лимфопролиферативное заболевание (лимфома, хронический лимфолейкоз) или нарушение соединительной ткани. Считается, что пациенты с первичной CAD имеют незначительное лимфопролиферативное поражение костного мозга. Как первичная, так и вторичная CAD являются приобретенными состояниями.

Методы.

Реагенты.

Эритроциты здоровых доноров пациентов, страдающих от CAD, получают венопункцией. Антитела против MASP-2, блокирующие функциональную активность лектинового пути, могут быть продуцированы, как описано в примере 10.

Способность антитела против MASP-2 блокировать активацию лектинового пути, опосредованную Холодовыми агглютинаинами, может быть определена следующим образом. Эритроциты пациентов с первой группой крови с положительным резус-фактором сенсibiliзируют с помощью Холодовых агглютининов (то есть IgM антител) в присутствии или отсутствии антител против MASP-2. Затем эритроциты испытывают на способность активировать лектиновый путь путем измерения связывания C3.

Принимая во внимание тот факт, что было показано, что антитела против MASP-2 блокируют активацию лектинового пути, предполагается, что антитела против MASP-2 могут быть эффективными при

блокировании опосредованных комплементом негативных последствий, связанных с болезнью холодовых агглютининов, и могут применяться в качестве терапевтического средства для лечения пациентов, страдающих от болезни холодовых агглютининов.

Пример 27.

В этом примере описываются методы оценки воздействия антитела против MASP-2 на лизис эритроцитов в образцах крови мышей с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS).

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) характеризуется гемолитической анемией, тромбоцитопенией и почечной недостаточностью, вызываемыми тромбоцитарными тромбами в капиллярах почки и других органах. aHUS связан с нарушением регуляции комплемента и может быть или спорадическим, или наследственным. aHUS связан с мутациями в генах, кодирующих активацию комплемента, включая фактор комплемента H, мембранный кофакторный белок В и фактор I, а также фактор комплемента H-связанный белок 1 (CFHR1) и фактор комплемента H-связанный белок 3 (CFHR3) (Zipfel, P.F., et al., *PLoS Genetics* 3(3):e41 (2007)). В этом примере описываются методы оценки воздействия антитела против MASP-2 на лизис эритроцитов в образцах крови aHUS мышей.

Методы.

Действие антител против MASP-2 при лечении aHUS может быть определено в экспериментальной модели этого заболевания на мышах, у которых эндогенный мышинный fH ген был заменен на человеческий гомолог, кодирующий мутантную форму fH, часто обнаруживаемую у пациентов с aHUS. См. публикацию Pickering M.C. et al., *J. Exp. Med.* 204 (6): 1249-1256 (2007), содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Как описано в публикации Pickering et al., у таких мышей развивается патология, подобная aHUS. Для оценки действия антител против MASP-2 при лечении aHUS, антитела против MASP-2 вводят мутантным aHUS мышам и сравнивают лизис эритроцитов, возникающий у мышей, подвергнутых лечению антителами против MASP-2, с лизисом эритроцитов у контрольных не подвергнутых лечению мышей. Принимая во внимание тот факт, что было показано, что антитела против MASP-2 блокируют активацию лектинового пути, предполагается, что антитела против MASP-2 могут быть эффективными при блокировании лизиса эритроцитов у млекопитающих, страдающих от aHUS.

Пример 28.

В этом примере описываются методы оценки действия антитела против MASP-2 при лечении глаукомы.

Актуальность/уровень изученности проблемы.

Было показано, что неконтролируемая активация комплемента способствует развитию дегенеративного повреждения ганглионарных клеток сетчатки глаза (RGCs), их синапсов и аксонов при глаукоме (см. Tezel G. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5071-5082 (2010)). Например, гистопатологические исследования тканей человека и *in vivo* исследования с использованием различных экспериментальных моделей на животных показали, что синтезируются компоненты комплемента, включая C1q и C3, и в глаукоматозной сетчатке образуется терминальный комплекс комплемента (см. Stasi K. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., *Exp Eye Res* 83:620-628 (2006)). Как позже описано в публикации Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008), синтез и отложение комплемента индуцируются ишемией/реперфузией сетчатки, и прерывание каскада реакций комплемента приостанавливает дегенеративное повреждение ганглионарных клеток сетчатки глаза. В этом исследовании, было обнаружено, что у мышей с таргетным нарушением компонента комплемента C3 проявляется отсрочка дегенеративного повреждения ганглионарных клеток сетчатки глаза (RGC) после транзиторной ишемии/реперфузии сетчатки по сравнению с нормальными животными.

Методы.

Проводят определение воздействия антител против MASP-2 на дегенеративное повреждение ганглионарных клеток сетчатки глаза ((RGC) в экспериментальной модели ишемии/реперфузии сетчатки глаза на животных, как описано в публикации Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008), содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Как описано в публикации Kuehn et al., ишемию сетчатки индуцируют путем анестезии животных, затем введения иглы с размером 30, соединенной с резервуаром, содержащим забуференный фосфатом физиологический раствор, через роговицу в переднюю камеру глаза. Резервуар с физиологическим раствором затем поднимают вверх для создания внутриглазного давления 104 мм.рт.ст., достаточного для полного прекращения циркуляции крови через сосудистую сеть сетчатки. Повышенную внутриглазную ишемию подтверждают по побледнению радужной оболочки, и ишемию сетчатки поддерживают в течение 45 минут только в левом глазу; правый глаз служит в качестве контроля и в отношении него не проводят катетеризации. Затем мышей умерщвляют или через 1 неделю, или через 3 недели после ишемического инсульта. Для оценки воздействия антитела против MASP, вводимого до ишемического инсульта, антитела против MASP-2 вводят мышам или местно в глаз, или системно.

Проводят иммуногистохимические исследования глаз, используя антитела против C1q и C3, для выявления отложения комплемента. Может быть также оценено повреждение зрительного нерва, исполь-

зую стандартные методы электронной микроскопии.

Количественное определение выживших ганглионарных клеток сетчатки глаза (RGC) проводят с использованием метки из гамма-синуклеина.

Результаты.

Как описано в публикации Kuehn et al., у контрольных нормальных мышей, транзистентная ишемия сетчатки приводит к дегенеративным изменениям зрительного нерва и к отложениям C1q и C3 на сетчатке, которые определяют иммуногистохимическим методом. В отличие от этого, C3 дефицитные мыши проявляли заметное уменьшение аксональной дегенерации, характеризующееся только незначительными уровнями повреждения зрительного нерва через 1 неделю после индуцирования. На основе этих результатов, предполагается, что аналогичные результаты могут быть получены при проведении этого исследования на MASP-2 нокаутных мышях, и при введении антител против MASP-2 нормальным мышам перед индуцированием ишемического инсульта.

Пример 29.

В этом примере было показано, что ингибитор MASP-2, такой как антитело против MASP-2, является эффективным для лечения состояний после радиоактивного облучения и/или лечения, облегчения или предупреждения острого лучевого синдрома.

Актуальность.

Облучение высокими дозами ионизирующего излучения приводит к летальному исходу по следующим двум основным механизмам: токсическое действие на костный мозг и развитие желудочно-кишечного синдрома. Токсическое действие на костный мозг приводит к снижению количества всех гематологических клеток, провоцируя летальный исход в результате инфекции и кровоизлияния. Желудочно-кишечный синдром представляет собой более тяжелую форму и вызывается утратой функции кишечного барьера, обусловленной дезинтеграцией эпителиального слоя кишечника, и утратой эндокринных функций кишечника. Это приводит к сепсису и связанному с ним синдрому системного воспалительного ответа, который может приводить к смерти.

Лектиновый путь комплемента представляет собой врожденный иммунный механизм, который инициирует воспаление в ответ на повреждение ткани и воздействие чужеродных поверхностей (то есть бактерий). Блокада этого пути приводит к улучшению результатов лечения у мышей в модели ишемического повреждения ткани кишечника или септического шока. Высказано предположение, что лектиновый путь может инициировать чрезмерное и опасное воспаление в ответ на повреждение ткани, вызванное радиоактивным

излучением. Поэтому, блокада лектинового пути может ослаблять вторичное повреждение и повышать выживаемость после острого радиационного воздействия.

Целью проводимого исследования, описанного в этом примере, является оценка влияния блокады лектинового пути на выживаемость мышей в экспериментальной модели лучевого поражения на мышах путем введения антител против мышиной MASP-2.

Методы и материалы.

Материалы. В этом исследовании использовали следующие материалы для испытаний: (i) высокоаффинное антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11) и (ii) высокоаффинное антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6), которые блокируют компонент белка MASP-2 лектинового пути комплемента, продуцируемого в трансфицированных клетках млекопитающих. Дозируемые концентрации составляли 1 мг/кг антитела против мышиной MASP-2 (mAbM11), 5 мг/кг антитела против человеческой MASP-2 (mAbH6) или стерильного физиологического раствора. Для каждой процедуры дозирования приготавливали соответствующий объем свежих растворов для дозирования.

Животные. Молодых взрослых самцов мышей линии Swiss-Webster получали из лаборатории Harlan Laboratories (Houston, TX). Животных помещали в клетки с твердым дном с подстилкой Alpha-Dri и обеспечивали их сертифицированным кормом для грызунов PMI 5002 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) и водой без ограничения. В клетках для содержания животных постоянно контролировали температуру и устанавливали цикл освещение 12 часов день/12 часов ночь.

Облучение. После акклиматизации в течение 2 недель в специальном помещении, проводили облучения всей площади поверхности тела мышей при дозах 6,5 и 7,0 Грей в группах по 10 животных с интенсивностью дозы 0,78 Грей/минуту, используя систему Therapax X-RAD 320, снабженную генератором рентгеновского излучения с высокой стабильностью, металлокерамической рентгеновской трубкой, работающей при 320 кВ, коллиматором с варьирующейся подачей рентгеновского излучения и фильтром (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT).

Приготовление и введение лекарственных средств. В соответствии с протоколом, определенный объем концентрированных исходных растворов разбавляли охлажденным на льду физиологическим раствором с получением растворов с дозами 0,2 мг/мл антитела против мышиной MASP-2 (mAbM11) или 0,5 мг/мл антитела против человеческой MASP-2 (mAbH6). Введение антител против MASP-2 mAbM11 и mAbH6 осуществляли с помощью интраперитонеальной инъекции иглой 25 размера, исходя из массы животного, для доставки 1 мг/кг mAbM11, 5 мг/кг mAbH6 или физиологического раствора, используемого в качестве плацебо.

Протокол исследования. Мышей случайным образом распределяли по группам, как указано в табл. 8. Один раз в день измеряли и регистрировали массу тела и температуру. Мышей в группах 7, 11 и 13 умерщвляли на 7 день после облучения, и собирали кровь путем сердечной пункции под глубокой анестезией. Животных, выживших на 30 день после облучения, умерщвляли тем же способом и собирали кровь. Из взятых проб крови приготавливали плазму в соответствии с протоколом и возвращали ее заказчику клинического исследования для проведения анализа.

Таблица 8
Исследуемые группы

Номер группы	Количество мышей в группе N	Уровень облучения (Грей)	Лечение	Режим дозирования
1	20	6,5	Плацебо	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
2	20	6,5	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	только за 18 часов до облучения
3	20	6,5	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
4	20	6,5	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
5	20	6,5	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbH6)	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
6	20	7,0	Плацебо	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
7	5	7,0	Плацебо	только через 2 часа после облучения
8	20	7,0	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	только за 18 часов до облучения
9	20	7,0	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
10	20	7,0	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	через 2 часа после облучения
11	5	7,0	Антитело против мышиной MASP-2 (mAbM11)	только через 2 часа после облучения
12	20	7,0	Антитело против MASP-2 человека (mAbH6)	за 18 часов до облучения, через 2 часа после облучения, еженедельная бустер-доза
13	5	нет	нет	нет

Статистический анализ.

Строили кривые выживаемости Каплана-Мейера, и использовали их для сравнения среднего времени выживания для групп, подвергнутых лечению, применяя логарифмический ранговый критерий и критерий Уилкоксона. Приводятся средние величины со стандартными отклонениями или средние величины со стандартной величиной ошибки среднего.

Проводили статистические сравнения с использованием двустороннего критерия Стьюдента для одной выборки между облученными животными контрольной группы и отдельными группами, подвергавшимися лечению.

Результаты.

Кривые выживаемости Каплана-Мейера для групп, облученных дозами 7,0 и 6,5 Грей, представлены на фиг. 32А и 32В, соответственно, и обобщены в табл. 9 ниже. В целом, лечение с помощью антител против мышиной MASP-2 (mAbM11) перед облучением приводило к повышению выживаемости облученных мышей по сравнению с выживаемостью облученных контрольных животных, которым вводили плацебо, при дозах облучения 6,5 Грей (повышение на 20%) и 7,0 Грей (повышение на 30%). При дозе облучения 6,5 Грей, введение антитела против мышиной MASP-2 после облучения приводило к умеренному повышению выживаемости (на 15%) по сравнению с выживаемостью контрольных облученных животных, которым вводили плацебо.

В сравнении, у всех подвергнутых лечению животных при дозе облучения 7,0 Грей наблюдалось повышение выживаемости по сравнению с выживаемостью облученных контрольных животных, которым вводили плацебо. Наибольшее изменение выживаемости наблюдалось у животных, которым вводили mAbH6, а именно, повышение выживаемости на 45% по сравнению с контрольными животными. Кроме того, при дозе облучения 7,0 Грей, первые случаи смертности наблюдались на 15-й день после облучения в группах, которым вводили mAbH6, и на 8-й день после облучения в группах облученных контрольных животных, которым вводили плацебо, то есть выживаемость в группе, подвергнутой лечению, на 7 дней превышала выживаемость контрольных животных. Среднее время до гибели мышей, которым вводили mAbH6 ($27,3 \pm 1,3$ дня), было значительно выше ($p=0,0087$) по сравнению с контрольными животными ($20,7 \pm 2,0$ дней) при дозе облучения 7,0 Грей.

На протяжении всего исследования регистрировали процент изменения массы тела по сравнению с массой тела за день до облучения (день -1). Временное снижение массы тела наблюдалось у всех облученных животных, при этом какого-либо различия в изменениях массы тела у групп, которым вводили mAbM11 или mAbH6, по сравнению с контролем, не наблюдалось (данные не показаны). По окончании исследования, у всех выживших животных наблюдалось увеличение массы тела по сравнению с массой тела до проведения исследования (день -1).

Таблица 9

Уровни выживаемости испытуемых животных, подвергнутых облучению

Испытуемая группа	Уровень облучения	Выживаемость (%)	Время до гибели (среднее $\pm$ SEM) дней	Количество дней до первого случая/последнего случая смерти
Контрольное облучение	6,5 Грей	65%	$24,0 \pm 2,0$	9/16
Введение mAbM11 до облучения	6,5 Грей	85%	$27,7 \pm 1,5$	13/17
Введение mAbM11 до и после облучения	6,5 Грей	65%	$24,0 \pm 2,0$	9/15
Введение mAbM11 после облучения	6,5 Грей	80%	$26,3 \pm 1,9$	9/13
Введение mAbH6 до и после облучения	6,5 Грей	65%	$24,6 \pm 1,9$	9/19
Контрольное облучение	7,0 Грей	35%	$20,7 \pm 2,0$	8/17
Введение mAbM11 до облучения	7,0 Грей	65%	$23,0 \pm 2,3$	7/13
Введение mAbM11 до и после облучения	7,0 Грей	55%	$21,6 \pm 2,2$	7/16
Введение mAbM11 после облучения	7,0 Грей	70%	$24,3 \pm 2,1$	9/14
Введение mAbH6 до и после облучения	7,0 Грей	80%	$27,3 \pm 1,3^*$	15/20
облучения				

* $p=0,0087$ по двустороннему критерию Стьюдента для одной выборки для облученных контрольных животных и группы облученных животных, подвергнутых лечению, при одной и той же дозе облучения.

Обсуждение.

Острый лучевой синдром состоит из трех определенных субсиндромов: гематопозитического, желудочно-кишечного и цереброваскулярного. Наблюдаемый синдром зависит от дозы облучения, при этом гематопозитические эффекты наблюдаются у человека при значительном частичном или полном облучении всей поверхности тела в дозе, превышающей 1 Грей. Гематопозитический синдром характеризуется сильным подавлением функции костного мозга, приводящим к панцитопении с изменениями формулы крови, количества эритроцитов, лейкоцитов, и тромбоцитов,

сопровождающимся поражением иммунной системы. В данном случае, как минимум, наблюдаются низкие количества нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови, нейтропения, высокая температура, и, как осложнение, сепсис и неконтролируемое кровотечение, приводящее к летальному исходу.

В настоящем исследовании было обнаружено, что введение mAbH6 приводит к повышению выживаемости самцов мышей линии Swiss-Webster, облученных по всей площади поверхности тела рентгеновским излучением в дозе 7,0 Грей. Следует отметить, что при дозе облучения 7,0 Грей, у 80% животных, которым вводили mAbH6, продолжительность жизни составляла до 30 дней, тогда как такая продолжительность жизни наблюдалась только у 35% контрольных облученных животных, которым вводили плацебо. Важно отметить, что первый случай гибели животных в этой группе, подвергнутой лечению, наступал только на 15-й день после облучения, то есть на 7 дней позже, чем это наблюдалось у контрольных облученных животных, которым вводили плацебо. Любопытно, что при более низкой дозе рентгеновского облучения (6,5 Грей), введение mAbH6 не оказывало какого-либо влияния на выживаемость или не давало какой-либо отсрочки летального исхода по сравнению с контрольными облученными животными, которым вводили плацебо. Такое различие в ответных реакциях на различные дозы облучения может быть связано с многими причинами, хотя для проверки любой гипотезы может потребоваться проведение дополнительных исследований, включая предварительный сбор проб для анализа микробиологических культур и для оценки гематологических параметров. Одно из простых объяснений может заключаться в том, что число животных, принадлежащих к указанным группам, не позволяет обнаружить какие-либо незначительные различия, связанные с лечением. Например, в группе с числом животных, равным двадцати ($n=20$), у 3 животных наблюдались различия в выживаемости в интервале от 65% (mAbH6, при дозе облучения 6,5 Грей) до 80% (mAbH6, при дозе облучения 7,0 Грей). С другой стороны, у 9 животных наблюдались различия в интервале от 35% (плацебо в качестве контроля при дозе облучения 7,0 Грей) до 80% (mAbH6, при дозе облучения 7,0 Грей), что явно свидетельствует о различии результатов, относящихся к группам животных, подвергавшихся лечению.

Полученные результаты показывают, что антитела против MASP-2 являются эффективными при лечении млекопитающего, подверженного риску возникновения вредных воздействий острого лучевого синдрома или страдающего от вредных воздействий острого лучевого синдрома.

Пример 30.

В этом примере показано, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, вызываемого менингококком (*Neisseria meningitidis*) после инфицирования или менингококком серогруппы А, или менингококком серогруппы В.

Методы.

Нокаутных MASP-2 мышей (MASP-2 KO мышей) создавали, как описано в примере 1. MASP-2 KO мышей в возрасте 10 недель ($n=10$) и немутантных мышей линии C57/BL6 ($n=10$) инокулировали путем внутрибрюшинной инъекции дозы $2,6 \times 10^7$ КОЕ менингококка серогруппы А Z2491 в объеме 100 мкл. Инфицирующую дозу вводили мышам в сочетании с декстраном железа при конечной концентрации 400 мг/кг. Наблюдения за выживаемостью мышей после инфицирования проводили в течение 72 ч.

В отдельном эксперименте, MASP-2 KO мышей в возрасте 10 недель ($n=10$) и немутантных мышей линии C57/BL6 ($n=10$) инокулировали путем внутрибрюшинной инъекции дозы 6×10^6 КОЕ менингококка серогруппы В штамма MC58 в объеме 100 мкл. Инфицирующую дозу вводили мышам в сочетании с декстраном железа при конечной концентрации 400 мг/кг. Наблюдения за выживаемостью мышей после инфицирования проводили в течение 72 ч. Для немутантных мышей и MASP-2 KO мышей также проводили оценку развития заболевания в баллах в течение 72 ч после инфицирования, используя параметры балльной оценки заболевания, описанные ниже в табл. 10, которые основаны на схеме, описанной в публикации Franssen et al. (2010), но с небольшими изменениями.

Таблица 10
Оценка развития заболевания в баллах, связанная
с клиническими признаками у инфицированных мышей

Клинические признаки	Оценка в баллах
Нормальные	0
Слегка взъерошенная шерсть	1
Взъерошенная шерсть, замедленный взгляд и влажные глаза	2
Взъерошенная шерсть, летаргия и закрытые глаза	3
Угнетенное состояние и отсутствие движения после стимуляции	4
Смерть	5

У мышей брали образцы крови с интервалами 1 ч после инфицирования и определяли в них уровень менингококка в сыворотке (log КОЕ/мл) для подтверждения наличия инфекции и определения скорости выведения бактерий из сыворотки.

Результаты.

На фиг. 33 представлена кривая Каплана-Майера, графически иллюстрирующая процент выживания MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после введения инфицирующей дозы $2,6 \times 10^7$ КОЕ менингококка серогруппы A Z2491. Как показано на фиг. 33, 100% MASP-2 КО мышей выживали на протяжении 72 ч после инфицирования. В отличие от этого, только 80% немутантных мышей ($p=0,012$) были еще живы через 24 ч после инфицирования, и только 50% немутантных мышей были все еще живы через 72 ч после инфицирования. Эти результаты показывают, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, вызываемого инфицированием менингококком серогруппы A Z2491.

На фиг. 34 представлена кривая Каплана-Майера, графически иллюстрирующая процент выживания MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после введения инфицирующей дозы 6×10^6 КОЕ менингококка серогруппы B штамма MC58. Как показано на фиг. 34, 90% MASP-2 КО мышей выживали в течение 72 ч после инфицирования. В отличие от этого, только 20% немутантных мышей ($p=0,0022$) были все еще живы через 24 ч после инфицирования. Эти результаты показывают, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, вызываемого инфицированием менингококком серогруппы B штамма MC58.

На фиг. 35 графически представлена величина log КОЕ/мл менингококка серогруппы B штамма MC58, определенная в разные моменты времени в образцах крови, взятых у MASP-2 КО мышей и немутантных мышей после внутрибрюшинного инфицирования 6×10^6 КОЕ менингококка серогруппы B штамма MC58 ($n=3$ в разные моменты времени для обеих групп мышей). Результаты представлены как средние значения $\pm$ SEM. Как показано на фиг. 35, у немутантных мышей уровень менингококка в крови достигал максимального значения приблизительно log КОЕ/мл 6,0 через 24 ч после инфицирования и снижался до log КОЕ/мл 4,0 через 36 ч после инфицирования. В отличие от этого, у MASP-2 КО мышей, уровень менингококка в крови достигал максимального значения приблизительно log КОЕ/мл 4,0 через 12 ч после инфицирования и снижался до log КОЕ/мл 1,0 через 36 ч после инфицирования (символ "*" обозначает $p<0,05$, символ "***" обозначает $p=0,0043$). Эти результаты показывают, что несмотря на то, что MASP-2 КО мыши были инфицированы той же дозой менингококка серогруппы B MC58, что и немутантные мыши, тем не менее, MASP-2 КО мыши характеризуются улучшенным клиренсом бактериемии по сравнению с немутантными мышами.

На фиг. 36 графически представлено среднее значение оценки развития заболевания в баллах для MASP-2 КО мышей и немутантных мышей через 3, 6, 12 и 24 ч после инфицирования 6×10^6 КОЕ менингококка серогруппы B штамма MC58. Как показано на фиг. 36, MASP-2 дефицитные мыши характеризовались высокой устойчивостью к инфекции с гораздо более низкими балльными оценками развития заболевания через 6 ч (символ "*" обозначает $p=0,0411$), 12 ч (символ "***" означает $p=0,0049$) и 24 ч (символ "****" обозначает $p=0,0049$) после инфицирования по сравнению с немутантными мышами. Результаты на фиг. 36 представлены как средние значения $\pm$ SEM.

Таким образом, результаты этого примера демонстрируют, что MASP-2 дефицитные мыши защищены от летального исхода, вызываемого менингококком, после инфицирования либо менингококком серогруппы A, либо менингококком серогруппы B.

Пример 31.

В этом примере показано, что введение антитела против MASP-2 после инфицирования менингококком увеличивает выживаемость мышей, инфицированных менингококком.

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Как описано в примере 10, белок крысиной MASP-2 использовали для отбора из фагового дисплея

библиотеки Fab, из которой был идентифицирован Fab2 № 11 в качестве функционально активного антитела. Из Fab2 № 11 генерировали полноразмерные антитела против изотипов крысиных IgG2c и мышиных IgG2a. Полноразмерное антитело против MASP-2 изотипа IgG2a мыши характеризовали фармакодинамическими параметрами (как описано в примере 19).

В этом примере, полноразмерное антитело против мышиной MASP-2, полученное из Fab2 № 11, анализировали в экспериментальной модели менингококковой инфекции на мышах.

Методы.

Изотип IgG2a полноразмерного антитела против мышиной MASP-2, полученный из Fab2 № 11, генерированный, как описано выше, подвергали испытанию в экспериментальной модели менингококковой инфекции на мышах следующим образом.

Введение моноклонального антитела (MoAb) против мышиной MASP-2 после инфицирования мышам линии C57/BL6 Charles River в возрасте 9 недель вводили ингибирующее антитело против мышиной MASP-2 (1,0 мг/кг) (n=12) или контрольное изотипное антитело (n=10) через 3 ч после внутрибрюшинной инъекции высокой дозы (4×10^6 КОЕ) менингококка серогруппы В штамма MC58.

Результаты.

На фиг. 37 представлена кривая Каплана-Майера, графически иллюстрирующая процент выживания мышей после введения инфицирующей дозы 4×10^6 КОЕ менингококка серогруппы В штамма MC58 с последующим введением через 3 ч после инфицирования или ингибирующего антитела против MASP-2 (1,0 мг/кг), или контрольного изотипного антитела. Как показано на фиг. 37, 90% мышей, которым вводили антитело против MASP-2, выживали в течение 72 ч после инфицирования. В отличие от этого, только 50% мышей, которым вводили изотипное контрольное антитело, выживали в течение 72 ч после инфицирования. Символ "*" обозначает значение $p=0,0301$, которое определяют путем сравнения двух кривых выживания.

Эти результаты показывают, что введение антитела против MASP-2 позволяет эффективно проводить лечение и повышает выживаемость субъектов, инфицированных менингококком.

Как показано в изобретении, применение антитела против MASP-2 при лечении субъекта, инфицированного менингококком, является эффективным при введении через 3 ч после инфицирования, и предполагается, что его действие будет эффективным в течение от 24 до 48 ч после инфицирования. Менингококковая инфекция (менингококкемия или менингит) представляет собой состояние, представляющее опасность для жизни и требующее срочной медицинской помощи, и терапию обычно начинают применять немедленно, если подозревается наличие менингококковой инфекции (то есть до того, как менингококк надежно идентифицирован как этиологический фактор).

На основании результатов для MASP-2 КО мышей, приведенных в примере 30, считают, что введение антитела против MASP-2 до инфицирования менингококком также может быть эффективным для предотвращения или уменьшения отрицательного воздействия инфекции.

Пример 32.

В этом примере показано, что введение антитела против MASP-2 эффективно для лечения менингококковой инфекции в человеческой сыворотке.

Актуальность.

Пациенты со сниженным уровнем функционального MBL в сыворотке характеризуются повышенной восприимчивостью к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572: 401-413 (2002)). Известно, что MBL распознает менингококк, и было показано, что MBL-дефицитные сыворотки не вызывают лизис менингококка.

На основании результатов, описанных в примерах 30 и 31, была проведена серия экспериментов для определения эффективности введения антитела против MASP-2 при лечении менингококковой инфекции в комплемент-дефицитных сыворотках и контрольных сыворотках человека. Эксперименты проводили при высокой концентрации сыворотки (20%) с целью сохранения пути активации комплемента.

Методы.

1. Бактерицидная активность сыворотки в различных комплемент-дефицитных сыворотках человека и в сыворотках человека, подвергнутых обработке антителом против человеческой MASP-2.

В этом эксперименте использовали следующие комплемент-дефицитные сыворотки человека и контрольные сыворотки человека.

Таблица 11
Подвергавшиеся испытаниям образцы сывороток человека
(показанные на фиг. 38)

Образец	Тип сыворотки
A	Сыворотка здорового человека (NHS)+антитело (Ab) против человеческой MASP-2
B	NHS+изотипное контрольное Ab
C	MBL-/- человеческая сыворотка
D	NHS
E	Термоинактивированная (HI) NHS

Из комбинаторной библиотеки антител выделяли рекомбинантное антитело против человеческой MASP-2 (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol., 296: 57-86 (2000)), используя рекомбинантное человеческое MASP-2A в качестве антигена (Chen, CB and Wallis, J. Biol. Chem. 276: 25894-25902 (2001)). Идентифицировали одноцепочечный фрагмент scFv антитела человека, который эффективно ингибировал опосредованную лектиновым путем активацию C4 и C3 в плазме человека ($IC_{50} \sim 20$ нМ), и превращали его в полноразмерное антитело против человеческого IgG4.

Инкубировали менингококк серогруппы B-MC58 с различными сыворотками, приведенными в таблице 11, концентрация каждой из которых составляла 20%, с добавлением или без добавления, ингибирующего антитела против человеческой MASP-2 (3 мкг в 100 мкл общего объема) при 37°C при перемешивании. Образцы отбирали в моменты времени через 0, 30, 60 и 90 минут, выделяли их и затем определяли количество жизнеспособных микроорганизмов. В качестве отрицательного контроля использовали термоинактивированную сыворотку человека.

Результаты.

На рисунке 38 графически представлена величина $\log$ КОЕ/мл количества жизнеспособных менингококков серогруппы B-MC58, определенная в разные моменты времени в образцах сыворотки человека, приведенных в табл. 11. В табл. 12 приведены результаты применения параметрического t-критерия Стьюдента для данных, приведенных на фиг. 38.

Таблица 12
Результаты применения параметрического t-критерия Стьюдента
для данных, приведенных на фиг. 38 (время 60 минут)

	Средняя	Статистически	Сводка P
	разность (Log)	значимая? $P < 0,05$?	значений
A в сравнении с B	-0,3678	Да	*** (0,0002)
A в сравнении с C	-1,1053	Да	*** (p<0,0001)
A в сравнении с D	-0,2111	Да	** (0,0012)
C в сравнении с D	1,9	Да	*** (p<0,0001)

Как показано на фиг. 38 и в табл. 12, комплемент-зависимая гибель менингококка в 20% сыворотке человека значительно увеличивалась при добавлении ингибирующего антитела против человеческой MASP-2.

2. Комплемент-зависимая гибель менингококка в 20% (по объему) мышинных сыворотках, дефицитных по MASP-2.

В этом эксперименте использовали следующие комплемент-дефицитные мышинные сыворотки и контрольные мышинные сыворотки.

Таблица 13
Образцы сыворотки мыши (показанные на фиг. 39)

Образец	Тип сыворотки
A	Немутантная
B	MA SP-2-/-
C	MBL A/C-/-
D	Немутантная термоинактивированная (HIS)

Инкубировали менингококк серогруппы B-MC58 с различными комплемент-дефицитными сыворотками мыши, концентрация каждой из которых составляла 20%, при 37°C при перемешивании. Образцы отбирали в моменты времени через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 минут, выделяли их и затем определяли количество жизнеспособных микроорганизмов. В качестве отрицательного контроля использовали термоинактивированную сыворотку человека.

Результаты.

На фиг. 39 графически представлена величина $\log$ КОЕ/мл количества жизнеспособных менинго-

кокков серогруппы B-MC58, определенная в разные моменты времени в образцах сыворотки мыши, показанных в табл. 13. Как показано на фиг. 39, сыворотки MASP-2-/- мышей имеют более высокую уровень бактерицидной активности в отношении менингококка, чем сыворотки немутантных мышей. Символ "***" обозначает значение $p=0,0058$, символ "****" обозначает значение $p=0,001$. В табл. 14 приведены результаты применения параметрического t-критерия Стьюдента для данных, приведенных на фиг. 39.

Таблица 14
Результаты применения параметрического t-критерия Стьюдента
для данных, приведенных на фиг. 39

Сравнение	Момент времени	Средняя разность (Log)	Статистическая значимость? $P<0,05$?	Сводка P значений
А в сравнении с В	60 мин	0,39	да	** (0.0058)
А в сравнении с В	90 мин	0,6741	да	*** (0.001)

Таким образом, результаты этого примера показывают, что MASP-2-/- сыворотки имеет более высокий уровень бактерицидной активности в отношении менингококка, чем сыворотки немутантных мышей.

Пример 33.

В этом примере проиллюстрировано ингибирующее действие дефицита MASP-2 на лизис эритроцитов образцов крови, полученных в экспериментальной модели пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) на мышах.

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), также называемая синдромом Марчафава-Микели, является приобретенным, потенциально опасным для жизни заболеванием крови, характеризующимся комплемент-индуцированной внутрисосудистой гемолитической анемией. Отличительным признаком PNH является хронический комплемент-опосредованный внутрисосудистый гемолиз, который возникает вследствие нерегулируемой активации комплемента по альтернативному пути, обусловленной отсутствием регуляторов комплемента CD55 и CD59 на эритроцитах PNH, с последующей гемоглобинурией и анемией (Lindorfer, M.A., et al., Blood 115 (11) (2010), Risitano, A.M, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11: 528-535 (2011)). Анемия при PNH вызвана разрушением эритроцитов в кровотоке. Симптомы PNH включают красную мочу, вследствие появления гемоглобина в моче, боли в спине, усталость, одышку и тромбоз. PNH может развиваться сама по себе, в этом случае ее называют "первичной PNH", или может быть связана с другими расстройствами костного мозга, такими как апластическая анемия, и в этом случае ее называют "вторичной PNH". Лечение PNH включает переливание крови в случае анемии, антикоагуляция в случае тромбоза и применение моноклонального антитела экулизумаба (Soliris), которое защищает клетки от иммунного повреждения путем ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., N. Engl. J Med. 350 (6): 552-9 (2004)). Экулизумаб (Soliris®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое таргетированно на компонент комплемента C5 и блокирует его расщепление с помощью C5-конвертаз, тем самым предотвращая образование C5a и сборку MAC. Лечение пациентов с ПНГ с помощью экулизумаба приводит к уменьшению внутрисосудистого гемолиза, измеряемому лактатдегидрогеназой (ЛДГ), и в следствие этого к стабилизации гемоглобина и независимости от трансфузии примерно у половины пациентов (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, том 11 (6) (2011)). Несмотря на то что почти все пациенты, подвергающиеся терапии с экулизумабом, достигают нормальных или почти нормальных уровней ЛДГ (вследствие регулирования внутрисосудистого гемолиза), тем не менее, только у около одной трети пациентов уровень гемоглобина достигает значения выше 11 г/дл, а у остальных пациентов при лечении экулизумабом продолжает проявляться анемия от умеренной до тяжелой формы (то есть зависящей от переливания крови), примерно в равном соотношении (Risitano AM et al., Blood 113: 4094-100 (2009)). Как описано в публикации Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11: 528-535 (2011), было обнаружено, что пациенты с PNH при лечении экулизумабом содержали C3-фрагменты, связанные со значительной частью их эритроцитов PNH (в то время как не подвергавшиеся лечению пациенты их не содержали), что позволяет сделать вывод о том, что связанные с мембраной фрагменты C3 выполняют функцию опсонов на эритроцитах PNH, что приводит к их захвату в ретикулоэндотелиальных клетках через специфические C3-рецепторы и последующему внесосудистому гемолизу. Поэтому, для тех пациентов, у которых развивается C3-опосредованный внесосудистый гемолиз, помимо применения экулизумаба необходимы и другие терапевтические стратегии, потому что они продолжают нуждаться в переливаниях эритроцитов. В этом примере описывается метод оценки воздействия MASP-2-дефицитной сыворотки и сыворотки, подвергнутой обработке MASP-2 ингибирующим средством, на лизис эритроцитов образцов крови, полученных в экспериментальной модели PNH на мышах, и продемонстрирована эффективность ингибирования MASP-2 для лечения субъектов, страдающие от PNH, а также подтверждается возможность применения ингибиторов MASP-2 для улучшения состояния, связанного с отрицательными последствиями внесосудистого гемолиза, опосредованного фрагментом C3, у субъектов с PNH, подвергающихся терапии ингибитором

C5, таким как экулизумаб.

Методы.

Экспериментальная модель PNH на животных.

Брали образцы крови у ген-таргетированных мышей с дефицитами Cтгу и C3 (Cтгу/C3-/-) и у CD55/CD59-дефицитных мышей. У этих мышей отсутствуют соответствующие регуляторы поверхности комплемента, и, поэтому, их эритроциты восприимчивы к спонтанному автолизу комплемента, как и клетки крови человека с PNH.

Для того чтобы еще больше сенсibilизировать эти эритроциты, эти клетки использовали с нанесением покрытия из маннана и без нанесения покрытия из маннана, и затем тестировали их на гемолиз в плазме WT C56/BL6, MBL нулевой плазме, MASP-2-/-плазме, сыворотке здорового человека, MBL-/-плазме человека, и в сыворотке здорового человека, подвергнутой обработке с помощью антитела против человеческой MASP-2.

1. Исследование гемолиза эритроцитов дважды дефицитных по Cтгу/C3 и CD55/CD59 мышей в MASP-2-дефицитных/истощенных сыворотках и контрольных сыворотках.

День 1. Приготовление мышиных эритроцитов ($\pm$ нанесение покрытия из маннана).

Материалы включали: свежую мышиную кровь, BBS/Mg²⁺/Ca²⁺ (4,4 mM барбитуровой кислоты, 1,8 mM барбитола натрия, 145 mM NaCl, pH 7,4, 5 mM Mg²⁺, 5 mM Ca²⁺), хлорид хрома, CrCl₃·6H₂O (0,5 мг/мл в BBS/Mg²⁺/Ca²⁺) и маннан, 100 мкг/мл в BBS/Mg²⁺/Ca²⁺.

Цельную кровь (2 мл) центрифугировали в течение 1-2 мин при 2 000 x g в охлаждаемой центрифуге при 4°C. Плазму и лейкоцитарную пленку отсасывали. Образец затем промывали три раза путем ресуспендирования осадка эритроцитов в 2 мл охлажденном льдом BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺ и повторения стадии центрифугирования. После третьей промывки, осадок ресуспендировали в 4 мл BBS/Mg²⁺/Ca²⁺. Аликвоту в объеме 2 мл эритроцитов резервировали в качестве контроля без нанесенного покрытия. К оставшимся 2 мл добавляли 2 мл CrCl₃ и 2 мл маннана, и образец инкубировали при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакцию прерывали путем добавления 7,5 мл BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺. Образец центрифугировали, как указано выше, ресуспендировали в 2 мл BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺ и промывали еще два раза, как указано выше, затем хранили при 4°C.

День 2. Исследование гемолиза.

Материалы включали BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺ (как указано выше), подвергаемые испытаниям сыворотки, 96-луночные круглодонные и плоскодонные планшеты и спектрофотометр, на котором считывают 96-луночные планшеты при 410-414 нм.

Сначала определяли концентрацию эритроцитов, и концентрацию клеток доводили до 10⁹/мл и хранили их при этой концентрации. Перед использованием, буфер для анализа разбавляли до 10⁸/мл, и затем использовали по 100 мкл на лунку. Гемолиз измеряли при 410-414 нм (что позволяло достигать большей чувствительности, чем при 541 нм). Разбавления подвергаемых испытаниям сывороток готовили в ледяной BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺. 100 мкл каждого разведения сыворотки раскапывали в лунки круглодонного планшета (см. макет планшета). Добавляли 100 мкл соответственно разбавленного препарата эритроцитов (то есть 10⁸/мл) (см. макет планшета), инкубировали при 37°C в течение приблизительно 1 ч и наблюдали за протеканием лизиса. В этот момент планшеты могут быть сфотографированы. Затем планшеты центрифугировали с максимальной скоростью в течение 5 минут. Из жидкой фазы отсасывали 100 мкл, переносили на планшеты с плоским дном, и регистрировали оптическую плотность (OD) при 410-414 нм. Осадки эритроцитов сохраняли (затем их можно подвергать лизированию водой, чтобы получить обратный результат).

Эксперимент № 1.

Свежую кровь получали от CD55/CD59 дважды дефицитных мышей, а кровь дважды дефицитных мышей Cтгу/C3 и эритроциты получали, как подробно описано в вышеуказанном протоколе. Клетки разделяли, и на половину клеток наносили слой маннана, другую половину оставляли необработанной, доводя конечную концентрацию до 1x10⁸ на мл, по 100 мкл из которых использовали в исследовании гемолиза, которое проводили, как описано выше.

Результаты эксперимента № 1. Лектиновый путь участвует в лизисе эритроцитов в экспериментальной модели PNH на животных.

В начальном эксперименте было выяснено, что не покрытые маннаном эритроциты немутантных мышей не подвергаются лизису ни в одной мышиной сыворотке. Далее было обнаружено, что мышиные эритроциты, покрытые маннаном, подвергались медленному лизису (в течение более 3 ч при 37°C) в сыворотке немутантных мышей, но не подвергались лизису в MBL нулевой сыворотке (данные не показаны).

Было установлено, что покрытые маннаном эритроциты Cтгу-/-мышей быстро лизируются в сыворотке человека, но не в инактивированной нагреванием сыворотке здорового человека (NHS). Важно отметить, что покрытые маннаном эритроциты Cтгу-/- мышей лизировались в NHS, разведенной до 1/640 (то есть лизис происходил во всех разведениях 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640) (данные не показаны). При этом разбавлении, альтернативный путь не функционирует (функциональная активность альтернативного пути значительно снижается при концентрации сыворотки ниже 8%).

Выводы из эксперимента № 1.

Покрытые маннаном эритроциты Crgy-/- мышей очень хорошо лизируются в сильно разбавленной человеческой сыворотке с MBL, но не в сыворотке без MBL. Эффективный лизис при каждой испытуемой концентрации сыворотки означает, что альтернативный путь не участвует или не требуется для этого лизиса. Неспособность MBL-дефицитной мышинной сыворотки и человеческой сыворотки лизировать покрытые маннаном эритроциты Crgy-/- мышей указывает на то, что классический путь также не имеет никакого отношения к наблюдаемому лизису. Так как требуется лектиновый путь распознавания молекул (таких как MBL), то этот лизис опосредуется лектиновым путем.

Эксперимент № 2.

Свежую кровь получали от Crgy/C3 и CD55/CD59 дважды дефицитных мышей, и анализировали покрытые маннаном эритроциты Crgy-/- мышей при исследовании гемолиза, как описано выше, в присутствии следующей человеческой сыворотки: нуль MBL; немутантная; NHS, предварительно обработанная антителом против человеческой MASP-2; и термоинактивированная NHS в качестве контроля.

Результаты эксперимента № 2. Ингибитор MASP-2 предотвращают лизис эритроцитов в экспериментальной модели PNH на животных.

Сыворотку здорового человека (NHS) с покрытыми маннаном эритроцитами Crgy-/- мыши инкубировали в разбавлениях, доведенных до 1/640 (то есть 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640), MBL-/- сыворотки человека, сыворотки здорового человека (NHS), предварительно обработанной моноклональным антителом против человеческой MASP-2, и термоинактивированной сыворотки здорового человека в качестве контроля.

Титрационный микропланшет ELISA подвергали центрифугированию, и нелизированные эритроциты собирали со дна круглодонного планшета. Собирали надосадочную жидкость из каждой лунки, и измеряли количество гемоглобина, высвобождаемого из лизированных эритроцитов, путем считывания оптической плотности при 415 нм (OD415) в планшет-ридере ELISA.

В контрольной термоинактивированной NHS (отрицательный контроль), как и ожидалось, лизис не наблюдался. MBL-/- человеческая сыворотка лизировала покрытые маннаном эритроциты мыши при разведениях 1/8 и 1/16. Сыворотка здорового человека (NHS), предварительно обработанная антителом против MASP-2, лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты при разведениях 1/8 и 1/16, тогда как немутантная человеческая сыворотка лизировала покрытые маннаном мышинные эритроциты до разведения 1/32.

На фиг. 40 графически представлен гемолиз (фотометрически измеренный по высвобождению гемоглобина из лизированных мышинных эритроцитов (Crgy/C3-/-) в надосадочную жидкость) покрытых маннаном мышинных эритроцитов при воздействии человеческой сыворотки в диапазоне различных концентраций в случае термоинактивированной (HI) сыворотки здорового человека (NHS), MBL-/- сыворотки, сыворотки здорового человека (NHS), предварительно обработанной антителом против MASP-2, и контрольной сыворотки здорового человека (NHS).

Результаты, изображенные на фиг. 40, показывают, что ингибирование MASP-2 с помощью антитела против MASP-2 значительно изменяло величину CH_{50} и ингибировало комплемент-опосредованный лизис сенсibilизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологической активации комплемента.

Эксперимент № 3.

Свежую кровь получали от Crgy/C3 и CD55/CD59 дважды дефицитных мышей, и анализировали эритроциты Crgy-/- мышей, не покрытые маннаном, при исследовании гемолиза, как описано выше, в присутствии следующей человеческой сыворотки: MBL-/-сыворотки, немутантной сыворотки, сыворотки здорового человека, предварительно обработанной антителом против MASP-2, и контрольной термоинактивированной сыворотки здорового человека.

Результаты.

На фиг. 41 графически представлен гемолиз (фотометрически измеренный по высвобождению гемоглобина из лизированных эритроцитов немутантной мыши в надосадочную жидкость) не покрытых маннаном мышинных эритроцитов при воздействии человеческой сыворотки в диапазоне различных концентраций в случае термоинактивированной (HI) сыворотки здорового человека (NHS), MBL-/- сыворотки, сыворотки здорового человека (NHS), предварительно обработанной антителом против MASP-2, и контрольной сыворотки здорового человека (NHS). Результаты, представленные на фиг. 41, показывают, что ингибирование MASP-2 приводит к ингибированию комплемент-опосредованного лизиса эритроцитов несенсибилизированных немутантных мышей.

На фиг. 42 графически представлен гемолиз (фотометрически измеренный по высвобождению гемоглобина из лизированных мышинных эритроцитов (CD55/59-/-) в надосадочную жидкость) не покрытых маннаном мышинных эритроцитов при воздействии человеческой сыворотки в диапазоне различных концентраций в случае термоинактивированной (HI) сыворотки здорового человека (NHS), MBL-/- сыворотки, сыворотки здорового человека (NHS), предварительно обработанной антителом против MASP-2, и контрольной сыворотки здорового человека (NHS).

Таблица 12

Значения CH_{50} в зависимости от концентраций сыворотки

Сыворотка	Немутантная	CD55/59-/-
Термоинактивированная сыворотка здорового человека (NHS)	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует
MBL АО/XX донор (MBL дефицитная)	7,2%	2,1%
NHS+антитело против MASP-2	5,4%	1,5%
Сыворотка здорового человека (NHS)	3,1%	0,73%

Примечание: " CH_{50} " представляет собой значение, при котором опосредованный комплементом гемолиз достигает 50%.

Таким образом, результаты этого примера показывают, что ингибирование MASP-2 приводит к ингибированию опосредованного комплементом лизиса сенсibilизированных и несенсibilизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологической активации комплемента. Поэтому, ингибитор MASP-2 может применяться для лечения субъектов, страдающих от ПНГ, а также может применяться для облегчения (то есть ингибирования, предотвращения или уменьшения тяжести) внесосудистого гемолиза у пациентов с PNH, подвергающихся лечению с помощью ингибитора C5, такого как экулизумаб (Soliris®).

Пример 34.

В этом примере описывается дополнительное клиническое исследование к исследованию, описанному выше в примере 29, представляющее дополнительное доказательство того, что ингибитор MASP-2, такой как антитело против MASP-2, является эффективным при лечении радиационного воздействия и/или для лечения, облегчения или предотвращения острого лучевого синдрома.

Актуальность. В исходном исследовании, описанном в примере 29, было показано, что введение мышам до облучения антитела против MASP-2 повышало выживаемость облученных мышей по сравнению с облученными контрольными животными, которым вводили плацебо, при уровнях облучения 6,5 Грэй и 7,0 Грэй. Кроме того, в примере 29 было продемонстрировано, что при уровне облучения 6,5 Грэй, введение антитела против MASP-2 после облучения приводит к умеренному увеличению выживаемости по сравнению с облученными контрольными животными, которым вводили плацебо. В этом примере описывается второе исследование последствий в результате облучения, которое проводили с целью подтверждения результатов первого исследования.

Методы.

Дизайн исследования А.

Мышей линии Swiss Webster (n=50) подвергали воздействию радиационного излучения (8,0 Грэй).

Оценивали влияние на смертность терапевтического действия антитела против MASP-2 (mAbH6 5 мг/кг), вводимого через 18 ч до облучения и через 2 ч после облучения, и после этого один раз в неделю.

Результаты исследования А.

Как показано на фиг. 43, было установлено, что введение антитела против MASP-2 mAbH6 увеличило выживаемость у мышей, подвергавшихся воздействию излучения 8,0 Грэй, при этом скорректированная средняя выживаемость увеличивалась с 4 до 6 дней по сравнению с контрольными мышами, которым вводили плацебо, и смертность уменьшалась на 12% по сравнению с контрольными мышами, которым вводили плацебо (логарифмический ранговый критерий, $p=0,040$).

Дизайн исследования В.

Мышей линии Swiss Webster (n=50) подвергали воздействию радиационного излучения (8,0 Грэй) в следующих контрольных группах (I: с плацебо) физиологический раствор в качестве контроля; (II: с низким дозированием) антитело против MASP-2 mAbH6 (5 мг/кг), вводимое за 18 ч до облучения и через 2 ч после облучения; (III: с высоким дозированием) mAbH6 (10 мг/кг), вводимое за 18 ч до облучения и через 2 ч после облучения; и (IV: с высоким дозированием после излучения) mAbH6 (10 мг/кг), вводимое только через 2 ч после облучения.

Результаты исследования В.

Введение антитела против MASP-2 до и после облучения приводило к средней выживаемости от 4 до 5 дней по сравнению с контрольными животными, которым вводили плацебо. Смертность у мышей, которым вводили антитела против MASP-2, снижалась на 6-12% по сравнению с контрольными мышами, которым вводили плацебо. Кроме того, было отмечено, что не наблюдалось никаких существенных отрицательных эффектов при лечении (данные не показаны).

Таким образом, результаты, приведенные в этом примере, согласуются с результатами, приведенными в примере 29, и они, кроме того демонстрируют, что антитела против MASP-2 эффективны при лечении млекопитающего, подверженного риску или страдающего от негативных последствий острого лучевого синдрома.

Пример 35.

В этом исследовании изучается эффект дефицита MASP-2 в экспериментальной модели индуцированного липополисахаридом (LPS) тромбоза на мышах.

Актуальность.

Гемолитический уремический синдром (HUS), который вызван кишечной палочкой, продуцирующей шига-токсин, является основной причиной острой почечной недостаточности у детей. В этом примере, для определения эффективности ингибирования MASP-2 с целью ингибирования или предотвращения образования внутрисосудистых тромбов, использовали экспериментальную модель Шварцмана индуцированного с помощью ЛПС тромбоза (микрососудистой коагуляции) на MASP-2^{-/-} (KO) мышах.

Методы.

Мышей MASP-2^{-/-} (n=9) и немутантных мышей (n=10) исследовали в экспериментальной модели Шварцмана индуцированного с помощью ЛПС тромбоза (микрососудистой коагуляции). Мышам вводили липосахарид (LPS) бактерии серратии (*Serratia*) и проводили непрерывное наблюдение тромбообразования с течением времени. Проводили сравнение частоты возникновения микротромбов и микрососудистой коагуляции, индуцированной с помощью ЛПС.

Результаты.

Примечательно, что у всех испытуемых MASP-2^{-/-} мышей (9/9) после введения липосахарида (LPS) бактерии серратии (*Serratia*) внутрисосудистые тромбы не образовывались. В отличие от этого, микротромбы были обнаружены у 7 из 10 тестируемых немутантных мышей (p=0,0031, точный тест Фишера). Как показано на фиг. 44, после инфицирования с помощью LPS измеряли время возникновения микрососудистой окклюзии у MASP-2^{-/-} мышей и немутантных мышей, выражая результаты в виде процентного количества немутантных мышей с тромбообразованием, измеренного в течение 60 минут, причем тромбообразование обнаруживалось уже приблизительно через 15 минут. Через 60 минут тромбообразование обнаруживалось вплоть до у 80% немутантных мышей. В отличие от этого, как показано на фиг. 44, через 60 минут ни у одной из MASP-2^{-/-} мышей тромбообразование обнаружено не было (логарифмический ранговый критерий: p=0,0005).

Эти результаты показывают, что ингибирование MASP-2 защищает от развития внутрисосудистых тромбов в модели HUS.

Пример 36.

В этом примере описывается действие антитела против MASP-2 в экспериментальной модели HUS на мышах с использованием внутрибрюшинной инъекции очищенного токсина Шига 2 (STX2) и LPS.

Уровень изученности проблемы.

Была разработана экспериментальная модель HUS на мышах с использованием внутрибрюшинной инъекции очищенного токсина Шига 2 (STX2) и LPS. Биохимический и микроматричный анализ почек мышей показал, что воздействие STX2 плюс LPS отличается от воздействия каждого из этих средств в отдельности. Анализ крови и сыворотки этих мышей выявил нейтрофилию, тромбоцитопению, гемолиз эритроцитов и повышенные содержания креатинина в сыворотке и азот мочевины в крови. Кроме того, гистологический анализ и электронная микроскопия почек мыши выявили осаждение фибрина в клубочках, конгестию эритроцитов, образование микротромбов и изменения ультраструктуры клубочков. Было установлено, что эта экспериментальная модель HUS на животных вызывает у мышей линии C57BL/6 все клинические симптомы человеческой HUS-патологии, включая тромбоцитопению, гемолитическую анемию и почечную недостаточность, которые определяют болезнь человека (*J. Immunol* 187 (1): 172-80 (2011)).

Методы.

Самки мышей линии C57BL/6, которые весили от 18 до 20 г, были приобретены у фирмы Charles River Laboratories и разделены на 2 группы (по 5 мышей в каждой группе). Одной группе мышей предварительно внутрибрюшинно вводили рекомбинантное антитело против MASP-2 mAbM11 (100 мкг на мышь, что соответствует конечной концентрации 5 мг/кг массы тела), разведенной в общем объеме 150 мкл физиологического раствора. Контрольной группе вводили физиологический раствор без какого-либо антитела. Через 6 ч после инъекции антитела против MASP-2 mAbM11, всем мышам комбинированно внутрибрюшинно вводили сублетальную дозу (3 мкг/животное, что соответствует 150 мкг/кг массы тела) LPS *Serratia marcescens* (L6136, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и дозу 4,5 нг на животного (что соответствует 225 нг/кг) STX2 (в два раза выше LD₅₀) в общем объеме 150 мкл. Введения физиологического раствора использовали для контроля.

После дозирования, проводили наблюдения за выживанием мышей каждые 6 ч. Выбраковывали мышей, как только они достигали летаргической стадии патологии HUS. Через 36 ч всех мышей выбраковывали и удаляли у них обе почки для иммуногистохимического анализа и сканирующей электронной микроскопии. Образцы крови отбирали в конце эксперимента путем пункции сердца. Сыворотку отделяли и хранили замороженной при -80°C для измерения уровней азот мочевины в крови и креатинина в сыворотке как в группах, которые были подвергнуты обработке, так и в контрольных группах.

Иммуногистохимический анализ.

Одну треть каждой почки мыши фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 ч, подвергали процессу обработки и заливали парафином. Приготавливали гистологические срезы толщиной три микрона и помещали их на подготовленные стекла для последующего окрашивания с помощью гематоксилина и эозина.

Электронная микроскопия.

Среднюю часть почек разрезали на блоки размером приблизительно от 1 до 2 мм³ и фиксировались в течение ночи при 4°C в 2,5% глутаральдегиде в 1× PBS. Затем фиксированную ткань исследовали на установке электронной микроскопии University of Leicester Electron Microscopy Facility.

Криостатные срезы.

Другую одну треть почек разрезали на блоки с размером примерно 1-2 мм³ и замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для криостатных срезов и анализа мРНК.

Результаты.

На фиг. 45 графически представлен процент выживания мышей, которым вводили физиологический раствор (n=5), и мышей, которым вводили антитело против MASP-2 (n=5), в модели, индуцированной с помощью STX/LPS, с течением времени (часов). Примечательно, что, как показано на фиг. 45, все контрольные мыши погибали через 42 ч. В отличие от этого, 100% мышей, которым вводили антитело против MASP-2, были живы в течение всего времени эксперимента. В соответствии с результатами, показанными на фиг. 45, было обнаружено, что все мыши, которым не вводили антитело против MASP-2, либо погибали, либо были выбракованы с признаками тяжелого заболевания, характеризовались значительными повреждениями клубочков, тогда как клубочки всех мышей, которым вводили антитело против MASP-2, выглядели нормально (данные не показаны). Эти результаты показывают, что ингибитор MASP-2s, такой как антитела против MASP-2, может применяться для лечения субъектов, страдающих тромботической микроангиопатией (ТМА) или подвергнутых риску развития тромботической микроангиопатии (ТМА), такой как гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный HUS (aHUS), или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП).

Пример 37.

В этом примере описывается эффект дефицита MASP-2 и ингибирования MASP-2 в экспериментальной модели тромбоза на мышах в результате повреждения эндотелиальных клеток, индуцированного FITC-декстраном/светом.

Уровень изученности проблемы/актуальность. Как показано в примерах 35 и 36, дефицит MASP-2 (MASP-2 KO) и ингибирование MASP-2 (путем введения ингибирующего антитела MASP-2) защищает мышей в модели типичного HUS, в которой у все контрольных мышей, подвергавшихся воздействию STX и LPS, развивалась тяжелая форма HUS, и мыши начинали агонизировать или погибать в течение 48 ч. Например, как показано на фиг. 54, выживали все мыши, которым вводили MASP-2 ингибирующее антитело и которых затем подвергали воздействию STX и LPS (точный критерий Фишера $p < 0,01$; N=5). Таким образом, анти-MASP-2 терапия защищает мышей в этой модели HUS.

Были проведены следующие эксперименты по анализу эффекта дефицита MASP-2 и ингибирования MASP-2 в экспериментальной модели тромботической микроангиопатии (ТМА) на мышах в результате повреждения эндотелиальных клеток, индуцированного флуоресцеином изотиоцианата (FITC)-декстраном, чтобы еще раз продемонстрировать преимущество ингибиторов MASP-2 при лечении HUS, aHUS, TTP, и ТМА с другими этиологиями.

Методы.

Прижизненная микроскопия.

Мышей готовили для прижизненной микроскопии, как описано, в публикации Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 2011. Вкратце, мышей анестезировали путем внутривенной инъекции кетамина (125 мг/кг массы тела, Ketanest, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germany) и ксилазина (12,5 мг/кг массы тела, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany), и помещали их на подстилку с подогревом для поддержания температуры тела на уровне 37°C. Прижизненную микроскопию проводили на прямом микроскопе (Leica, Wetzlar, Germany) с иммерсионным (физиологический раствор) объективом (увеличение 40/0,75 числовая апертура, Zeiss, Jena, Germany). Для облегчения дыхания мышей интубировали с использованием трубки из полиэтилена PE 90 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA). Левую сонную артерию канюлировали с помощью трубки из PE 10 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA) для отбора проб крови и системного введения моноклонального антитела (mAb).

Приготовление препарата мышцы, поднимающей яичко.

Хирургическое препарирование мышцы, поднимающей яичко, для прижизненной микроскопии проводили, как описано в публикации Sperandio et al., Blood, 97:3812-3819, 2001. Вкратце, вскрывали мошонку, и делали подвижной мышцу, поднимающую яичко. После продольного разреза и распределения мышцы на покровном стекле, эпидидимис и яички перемещали в сторону и закрепляли для полного доступа микроскопа к капиллярному кровообращению в мышце, поднимающей яичко. Вены мышцы, поднимающей яичко, регистрировали с помощью видеокамеры на основе устройства с зарядовой связью (CF8/1; Kappa, Gleichen, Germany) на регистрирующем устройстве Panasonic S-VHS. Мышцу, поднимающую яичко, обрызгивали терморегулируемым (35°C) забуференным бикарбонатом физиологическим раствором, как ранее описано в публикации Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 2011.

Фотовозбуждение модели повреждения, вызванного FITC-декстраном.

Вызывали контролируемое зависимое от дозы облучения света сосудистое повреждение эндотелия венул и артериол мышцы, поднимающей яичко, путем возбуждения фототоксического действия (FITC)-

декстрана (№ по каталогу FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.). Эта процедура инициирует локализованный тромбоз. В качестве фототоксического реагента вводили 60 мкл 10% (масса на единицу объема) раствора FITC-декстран через доступ к левой сонной артерии и позволяли ему гомогенно распространиться в циркулирующей крови в течение 10 минут. После выбора хорошо перфузируемой вены, фокусировали свет галогенной лампы с интенсивностью от низкой до средней (800-1500) на исследуемом сосуде с целью индуцирования флуоресценции FITC-декстрана и фототоксичности, от низкой до умеренной, для эндотелиальной поверхности для стимулирования воспроизводимого контролируемого тромбоза. Необходимую фототоксическую интенсивность света для возбуждения FITC-декстрана генерировали с помощью галогенной лампы (12 в, 100 Вт, Zeiss, Oberkochen, Germany). Фототоксичность, возникающая в результате индуцированного светом возбуждения флуорохрома, зависит от порога интенсивности светового потока и/или длительности освещения и обусловлена или непосредственным нагревом эндотелиальной поверхности, либо образованием реакционноспособных кислородных радикалов, как описано в публикации Steinbauer et al., *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298, 2000.

Измеряли интенсивность света, сфокусированного на каждом сосуде, с целью корректировки, используя изменяющий длину волны диодный детектор для измерений низкой мощности (Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA). Проводили офлайн анализ видеоизображений с помощью компьютеризированной системы анализа циркуляции крови в капиллярных сосудах (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg), и измеряли скорости эритроцитов, как описано в публикации Zeintl et al., *Int J Microcirc Clin Exp*, 8(3): 293-302, 2000.

Применение ингибирующего моноклонального антитела (mAbH6) против человеческой MASP-2 и контроль с помощью плацебо перед индуцированием тромбоза.

Используя протокол слепого исследования, самцам однопаметных немутантных мышей линии C57BL/6 в возрасте 9 недель вводили внутривенно или рекомбинантное моноклональное антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6), ингибитор функциональной активности MASP-2 (вводимый при конечной концентрации 10 мг/кг массы тела), либо такое же количество изотипного антитела в качестве контроля (без ингибирующей активности в отношении MASP-2) за 16 ч до фототоксического индуцирования тромбоза в экспериментальной модели прижизненной микроскопии мыши, поднимающей яйцо. За час до индуцирования тромбоза, вводили вторую дозу либо mAbH6, либо контрольного антитела. В этой модели также оценивали MASP-2 нокаутных (KO) мышей.

Моноклональное антитело mAbH6 (созданное против рекомбинантной человеческой MASP-2) является мощным ингибитором функциональной активности человеческой MASP-2, который дает перекрестную реакцию, связывается с MASP-2 и ингибирует мышиную MASP-2, но с более низкой аффинностью из-за его видоспецифичности (данные не показаны). Чтобы компенсировать низкое сродство mAbH6 к мышинной MASP-2, mAbH6 вводили при высокой концентрации (10 мг/кг массы тела) с целью преодоления разницы в видовой специфичности и меньшего сродства к мышинной MASP-2, чтобы обеспечить эффективную блокаду функциональной активности мышинной MASP-2 в условиях *in vivo*.

В этом слепом исследовании, регистрировали время, необходимое для полной окклюзии каждой отдельно испытываемой вены (критериями отбора являлись сопоставимые диаметры и скорости кровотока).

Оценивали процент мышей с микрососудистой окклюзией, время возникновения окклюзии и время, прошедшее до возникновения окклюзии, при наблюдении в течение 60 минут, используя видеозапись результатов исследования методом прижизненной микроскопии.

Результаты.

На фиг. 46 графически представлен в форме функции от времени, прошедшего после индуцирования повреждения, процент мышей с микрососудистой окклюзией в модели FITC/декстран УФ-излучение после введения изотипного контрольного антитела или антитела mAbH6 против человеческой MASP-2 (10 мг/кг), дозированных за 16 ч и за 1 ч до инъекции FITC/декстран. Как показано на фиг. 46, у 85% немутантных мышей, получавших контрольное изотипное антитело, возникала окклюзия в течение 30 минут или менее, тогда как только у 19% немутантных мышей, которым предварительно вводили антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6), возникала окклюзия в течение того же периода времени, и происходила отсрочка времени возникновения окклюзии у мышей, у которых со временем все же возникала окклюзия, в группе, в которой вводили антитело против человеческой MASP-2. Следует также отметить, что у трех мышей, которым вводили mAbH6 против MASP-2, вообще не возникала окклюзия в течение 60 минут периода наблюдения (то есть они были защищены от тромботической окклюзии).

На фиг. 47 графически представлено время окклюзии в минутах для мышей, которым вводили антителом против человеческой MASP-2 (mAbH6) и контрольное изотипное антитело. Данные представлены в виде разброса точек со средними значениями (горизонтальные линии) и линиями стандартными ошибок (вертикальные линии). На этой фигуре показано время окклюзии у мышей, в случае, если окклюзия обнаруживалась. Поэтому, три мыши, которым вводили MASP-2 и у которых не обнаруживали окклюзию в течение 60 минут наблюдения, не учитывали при этом анализе (не было ни одной контрольной мыши, у которой бы не возникла окклюзия). В качестве статистического критерия при анализе использовали критерий Стьюдента для одной выборки; где "*" обозначает значение $p=0,0129$. Как показано на

фиг. 47, у четырех мышей, которым вводили антитело против MASP-2 (mAbH6), и у которых возникала окклюзия, введение антитела против MASP-2 значительно увеличивало время венозной окклюзии в модели тромбоза, вследствие индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия при низкой интенсивности света (800-1500) по сравнению с мышами, которым вводили контрольное изотипное антитело. Среднее время полной окклюзии для контрольного изотипного антитела составляло 19,75 минут, тогда как среднее время полной окклюзии для группы мышей, которым вводили антитело против MASP-2, составляло 32,5 минуты.

На фиг. 48 графически представлено время до возникновения окклюзии в минутах для немутантных мышей, MASP-2 KO мышей и немутантных мышей, которым предварительно внутрибрюшинно вводили антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6) при 10 мг/кг за 16 ч, а затем снова за 1 час до индуцирования тромбоза в модели тромбоза, индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия при низкой интенсивности света (800-1500). На фиг. 48 приведены данные только для животных, у которых возникала окклюзия; $n=2$ для немутантных мышей, которым вводили контрольное изотипное антитело; $n=2$ для MASP-2 KO мышей; и $n=4$ для немутантных мышей, которым вводили антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6). Символ "*" обозначает значение $p < 0,01$. Как показано на фиг. 48, дефицит MASP-2 и ингибирование MASP-2 (mAbH6 при 10 мг/кг) увеличивали время венозной окклюзии в экспериментальной модели тромбоза, индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия при низкой интенсивности света (800-1500).

Выводы.

Результаты этого примера дополнительно показывают, что MASP-2 ингибирующее средство, которое блокирует лектиновый путь (например, антитела, блокирующие функцию MASP-2), ингибирует в экспериментальной модели ТМА на мышах микрососудистую коагуляцию и тромбоз, которые являются отличительными признаками многих микроангиопатических расстройств. Поэтому, предполагается, что введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как ингибирующее антитело против MASP-2, может стать эффективной терапией для пациентов, страдающих HUS, aHUS, TTP или другими микроангиопатическими расстройствами и может обеспечивать защиту от микрососудистой коагуляции и тромбоза.

Пример 38.

В этом примере описывается исследование, которое демонстрирует, что антитело (mAbH6), ингибирующее человеческую MASP-2, не влияет на функцию тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами человеческой плазме.

Уровень изученности проблемы/актуальность. Как показано в примере 37, обнаружено, что ингибирование MASP-2 с помощью ингибирующего антитела против человеческой MASP-2 (mAbH6) увеличивало время венозной окклюзии в экспериментальной модели тромбоза, индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия. Проводили следующий эксперимент с целью определения, влияет ли MASP-2 ингибирующее антитело (mAbH6) на функцию тромбоцитов.

Методы. Изучали влияние антитела mAbH6 против человеческой MASP-2 на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов следующим образом. Добавляли 40 мкл раствора антитела mAbH6 против человеческой MASP-2 с концентрацией или 1 мкг/мл, или 0,1 мкг/мл к 360 мкл свежеприготовленной плазмы, обогащенной тромбоцитами. В качестве отрицательного контроля использовали контрольное изотипное антитело. После добавления антитела в плазму, индуцировали активацию тромбоцитов путем добавления АДФ (аденозиндифосфата) при конечной концентрации 2 мкМ. Начинали исследования путем перемешивания растворов с помощью маленького магнита в кювете объемом 1 мл. Агрегация тромбоцитов измеряли на двухканальном оптическом люминесцентном агрегометре для тромбоцитов цельной крови модели 700 фирмы Chrono-log.

Результаты.

Процент агрегации в растворах измеряли в течение 5 мин. Результаты показаны ниже в табл. 13.

Таблица 13
Агрегация тромбоцитов в течение 5 мин

Антитело	Полнота агрегации (процент агрегации)	Угол наклона кривой (процент агрегации от времени)
Антитело против MASP-2 (mAbH6) (1 мкг/мл)	46%	59
Изотипное контрольное антитело (1 мкг/мл)	49%	64
Антитело против MASP-2 (mAbH6) (0,1 мкг/мл)	52%	63
Изотипное контрольное антитело (0,1 мкг/мл)	46%	59

Как показано выше в табл. 13, не наблюдалось значимой разницы между агрегацией индуцированных с помощью АДФ тромбоцитов, обработанных контрольным антителом или антителом mAbH6 против MASP-2. Эти результаты показывают, что антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6) не влияет на функцию тромбоцитов. Поэтому результаты, описанные в примере 37, которые показывали, что ингибирование MASP-2 ингибирующим антителом против человеческой MASP-2 (mAbH6) увеличивает время венозной окклюзии в модели тромбоза, вследствие индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия, не были вызваны воздействием mAbH6 на функцию тромбоцитов. Таким образом, ингибирование MASP-2 предотвращает тромбоз без прямого воздействия на функцию тромбоцитов, обнаруживая терапевтический механизм, отличный от существующих анти-тромботических средств.

Пример 39.

В этом примере описывается влияние ингибирования MASP-2 на тромбообразование и окклюзию сосудов в экспериментальной модели ТМА на мышах.

Уровень изученности проблемы/актуальности. Лектиновый путь играет доминирующую роль в активации системы комплемента в условиях стресса или повреждения эндотелиальных клеток. Эта активация быстро усиливается по альтернативному пути, который дисрегулирован у многих пациентах с проявлением aHUS. Исходя из этого, предполагается, что предотвращение активации MASP-2 и лектинового пути может прерывать последовательность ферментативных реакций, которые приводят к образованию мембраноатакующего комплекса, активации тромбоцитов и рекрутменту лейкоцитов. Это эффект ограничивает повреждение ткани.

Кроме того, MASP-2 обладает фактор Ха-подобной активностью и расщепляет протромбин с образованием тромбина. Эта активация коагулирующей системы, управляемая MASP-2, может привести к дисбалансу гемостаза и к патологии ТМА. Таким образом, предполагается, что ингибирование MASP-2 с использованием ингибитора MASP-2, такого как MASP-2 ингибирующее антитело, которое блокирует активацию комплемента и коагулирующих систем, улучшит клинические результаты в случае aHUS и других связанных с ТМА состояний.

Как показано в примере 37, было обнаружено, что ингибирование MASP-2 с помощью ингибирующего антитела против человеческой MASP-2 (mAbH6) увеличивало время венозной окклюзии в модели тромбоза, вследствие индуцированного с помощью FITC-декстрана/света повреждения клеток эндотелия. В этой модели ТМА, мышей сенсibilizировали путем внутривенного введения FITC-декстрана с последующей локализованной фотоактивацией FITC-декстрана в микроциркуляторном русле мышцы, поднимающей яичко (Thorlacius H et al., Eur J Clin. Invest 30 (9): 804-10, 2000, Agero et al., Toxicon 50 (5): 698-706, 2007).

Для того чтобы определить, оказывает ли MASP-2 ингибирующее антитело (mAbH6) зависимое от дозы воздействие на тромбообразование и окклюзию сосуда в экспериментальной модели ТМА на мышах, проведен следующий эксперимент.

Методы.

Индуцировали локализованный тромбоз путем фотоактивации декстраном, меченым флуоресцеин изотиоцианатом (FITC-декстраном) в микроциркуляторном русле мышцы, поднимающей яичко, мышцей линии C57 Bl/6, и использовали метод прижизненной микроскопии для определения начала тромбообразования и окклюзии сосуда с помощью методов, описанных в примере 37, со следующими изменениями. Группам мышей внутривенно вводили mAbH6 (2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное изотипное антитело (20 мг/кг) за один час до индуцирования ТМА. Регистрировали время начала тромбообразования и время завершения окклюзии сосудов. Для оценки размера сосуда, скорости кровотока, интенсивности света, скорости начала тромбообразования как эквивалента адгезии тромбоцитов, времени до начала тромбообразования, скорости полной окклюзии сосуда и время до полной окклюзии сосуда использовали анализ воспроизводимых видеозаписей изображений прижизненной микроскопии, записанных в течение от 30 до 60 мин. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SigmaPlot v12.0.

Результаты.

Иницирование тромбообразования.

На фиг. 49 представлена кривая Каплана-Майера, показывающая процент мышей с тромбами как функцию от времени при индуцированной с помощью FITC-декстрана тромботической микроангиопатии у мышей, которым вводили возрастающие дозы ингибирующее антитело против человеческой MASP-2 (mAbH6 при 2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное изотипное антитело. Как показано на фиг. 49, наблюдалась зависимость от дозы отсрочка иницирования тромбообразования у мышей, которым вводили mAbH6, по сравнению с мышами, которым вводили контрольное антитело.

На фиг. 50 графически представлено среднее время (в минутах) до начала тромбообразования в зависимости от дозы mAbH6 (* $p < 0,01$ по сравнению с контролем). Как показано на фиг. 50, среднее время до начала тромбообразования увеличивалось с увеличением дозы mAbH6 с 6,8 минут в контрольной группе до 17,7 минут в группе, в которой вводили 20 мг/кг mAbH6 ($p < 0,01$). Основные экспериментальные данные и статистический анализ приведены в табл. 14 и 15.

Время начала тромбообразования у отдельных мышей, записанное на основе оценки видеозаписи, подробно описано ниже в табл. 14.

Таблица 14

Время начала тромбообразования после повреждения, индуцированного красителем и светом

Введение контрольного антитела		Введение антитела mAbH6		
Время начала тромбообразования (минуты)	Контроль	2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
	6,07	5,93	12,75	10,00
	1,07	6,95	2,53	10,33
	8,00	8,92	14,00	21,00
	2,40	11,92	3,05	11,50
	8,48	12,75	8,00	19,00
	4,00	12,53	8,17	10,37
	4,00		15,83	22,65
	7,83		11,70	16,37
	6,83		50,67	21,75*
	15,00			32,25*
	15,67			

* в сосудах не обнаруживали начала тромбообразования в течение указанного периода времени наблюдения.

Статистический анализ сравнения времени начала окклюзии среди животных, которым вводили контрольное антитело и антитело mAbH6, приведен ниже в табл. 15.

Таблица 15

Время до возникновения окклюзии. Данные исследования зависимости доза-эффект при индуцировании с помощью FITC-декстроза

Статистика	Контроль	mAbH6 (2 мг/кг)	mAbH6 (10 мг/кг)	mAbH6 (20 мг/кг)
Число событий/ число животных (%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80.0%)
Среднее время (минуты) (95% CI)	6,8 (2,4, 8,5)	10,4 (5,9, 12,8)	11,7 (2,5, 15,8)	17,7 (10,0, 22,7)
Критерий Уилкоксона p-значение*		0,2364	0,1963	0,0016

Событие=наблюдаемое время до начала.

Среднее время (минуты) и его 95% CI были основаны на оценке Каплана-Майера.

NE = не оценивали.

* p-значения вычисляли с помощью критерия сравнения Dunnett-Hsu.

Микрососудистая окклюзия.

На фиг. 51 представлена кривая Каплана-Майера, на которой показан процент мышей с микрососудистой окклюзией в зависимости от времени при индуцированной с помощью FITC-декстрана тромботической микроангиопатии у мышей, которым вводили возрастающие дозы ингибирующего антитела против человеческой MASP-2 (mAbH6 при 2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное изотипное антитело. Как показано на фиг. 51, наблюдалась отсрочка возникновения полной микрососудистой окклюзии в группах мышей, которым вводили mAbH6, по сравнению с контрольными мышами.

На фиг. 52 графически представлено среднее время до возникновения микрососудистой окклюзии в зависимости от дозы mAbH6 (*p<0,05 по сравнению с контролем). Как показано на фиг. 52, среднее время для возникновения полной микрососудистой окклюзии увеличилось с 23,3 минут в контрольной группе до 38,6 минут в группе, в которой вводили 2 мг/кг mAbH6 (p <0,05). Дозы 10 мг/кг или 20 мг/кг mAbH6 оказывали такое же действие (среднее время полной микрососудистой окклюзии составляло, соответственно, 40,3 и 38 минут), как в группе, в которой вводили 2 мг/кг mAbH6. Основные экспериментальные данные и их статистический анализ представлены в табл. 16 и 17.

Время возникновения полной окклюзии сосуда у отдельных мышей, зарегистрированное на основе

первичной оценки видеографических записей, подробно описано ниже в табл. 16.

Таблица 16

Время возникновения окклюзии после повреждения,
индуцированного при воздействии света и красителя

Введение контрольного антитела		Введение антитела mAbH6		
Время начала окклюзии (минуты)	Контроль	2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
	37,50	42,3	30,92	38,00
	29,07	21,91	17,53	28,00
	27,12	24,4	51,38	40,58
	19,38	31,38	36,88	33,00
	19,55	61,17*	26,83	39,10
	18,00	61,55*	40,28	32,03
	16,50		55,83	38,53
	23,33		71,93*	21,75*
	14,83		98,22*	32,25*
	30*			33,17*
	61,8*			

* в сосудах не происходило полной окклюзии в течение указанного времени наблюдения.

Статистический анализ сравнения времени возникновения полной окклюзии среди животных, которым вводили контрольное антитело и антитело mAbH6, приведен ниже в табл. 17.

Таблица 17

Время до возникновения микрососудистой окклюзии
Данные исследования зависимости доза-эффект при индуцировании с помощью FITC-декстроза

Статистика	Контроль	mAbH6 (2 мг/кг)	mAbH6 (10 мг/кг)	mAbH6 (20 мг/кг)
Число событий/ число животных (%)	9/11 (81,8%)	4/6 (66,7%)	7/9 (77,8%)	7/10 (70,0%)
Среднее время (минуты) (95% CI)	23,3 (16,5, 37,5)	36,8 (21,9, NE)	40,3 (17,5, NE)	38,0 (28,0, 40,6)
Критерий Уилкоксона p-значение*		0,0456	0,0285	0,0260

Событие=время до начала окклюзии.

Среднее время (минуты) и его 95% CI были основаны на оценке Каплана-Майера.

NE=не оценивали.

*p-значения вычисляли с помощью критерия сравнения Dunnett-Hsu.

Краткие выводы.

Как в обобщенном виде приведено в табл. 18, наблюдалась зависимость от дозы отсрочка инициирования тромбообразования у мышей, которым вводили mAbH6, по сравнению с мышами, которым вводили контрольное антитело (среднее время до возникновения тромбоза от 10,4 до 17,7 минут против 6,8 минут). Среднее время возникновения полной окклюзии характеризовалось значительной отсрочкой во всех группах, в которых вводили mAbH6, по сравнению с группами, в которых вводили контрольное антитело (табл. 18).

Таблица 18
Среднее время до возникновения тромбообразования и полной окклюзии

	Контроль	mAbH6 (2 мг/кг)	mAbH6 (10 мг/кг)	mAbH6 (20 мг/кг)
Среднее# время до начала тромбообразования (минуты)	6,8	10,4	11,7	17,7*
Среднее# время до возникновения полной микрососудистой окклюзии (минуты)	23,3	36,8*	40,3*	38,0*

Средние значения основаны на оценке Каплана-Маiera.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем (критерий Уилкоксона, скорректированный с помощью критерия Dunnett-Hsu для множественных сравнений).

Эти результаты показывают, что mAbH6, человеческое моноклональное антитело, которое связывается с MASP-2 и блокирует лектиновый путь системы комплемента, уменьшает микрососудистый тромбоз в зависимости от дозы в экспериментальной модели TMA на мышах. Поэтому, предполагается, что введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как MASP-2 ингибирующее антитело, может стать эффективной терапией для пациентов, страдающих HUS, aHUS, TTP или другими микроангиопатическими расстройствами, такими как другие формы TMA, включая катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS), системную болезнь Дегоса и TMA на фоне рака, химиотерапии рака и трансплантации, и может обеспечивать защиту от микрососудистой коагуляции и тромбоза.

Пример 40.

В этом примере описывается идентификация с помощью фагового дисплея библиотеки полностью человеческих scFv антител, которые связываются с MASP-2 и ингибируют лектин-опосредованную активацию комплемента, оставляя при этом незатронутыми классический (C1q-зависимый) путь и компоненты альтернативного пути иммунной системы.

Общее описание.

Полностью человеческие высокоаффинные антитела MASP-2 идентифицировали путем скрининга фагового дисплея библиотеки. Варибельные фрагменты легких и тяжелых фрагментов антител выделяли как в формате scFv, так и в полноразмерном формате IgG. Человеческие антитела против MASP-2 применяются для ингибирования клеточного повреждения, связанного с активацией альтернативного пути комплемента, опосредованной лектиновым путем, оставляя незатронутым компонент классического (C1q-зависимого) пути иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления испытываемые MASP-2 ингибирующие антитела имеют следующие характеристики: (а) высокую аффинность к человеческой MASP-2 (например, K_D 10 нМ или менее) и (b) ингибирование MASP-2-зависимой активности комплемента в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50} 30 нМ или менее.

Методы.

Экспрессия полноразмерной каталитически неактивной MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческой MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующую полипептид человеческой MASP-2 с лидерной последовательностью (SEQ ID NO: 5), субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pCI Neo (Promega), который запускает эукариотическую экспрессию под контролем области энхансера/промотора CMV (описанной в публикации Kaufman RJ et al., Nucleic Acids Research 19: 4485 90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185: 537, 66 (1991)).

Для генерирования каталитически неактивного белка человеческой MASP-2A, проводили сайт-направленный мутагенез, как описано в патентном документе US2007/0172483, содержание которого включено в настоящее изобретение путем ссылки на него. После электрофореза в агарозном геле, продукты PCR очищали, и генерировали препарат диска хромосом и единичные аденозиновые перекрытия, используя стандартный метод наращивания. Затем полученную с аденозином на конце MASP-2A клонировали в простой вектор pGEM-T, трансформированный в кишечную палочку. Человеческую MASP-2A дополнительно субклонировали в любой из экспрессирующих векторов млекопитающих pED или pCI-Neo.

Описанную выше экспрессионную конструкцию MASP-2A трансфицировали в клетки DXB1, используя стандартную процедуру трансфекции фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A продуцировали в среде, не содержащей сыворотку, для гарантии того, что препараты не загрязнены другими сывороточными белками. Собирали среду из конфлюэнтных клеток через день (в общей сложности четыре раза). Уровень рекомбинантной MASP-2A составлял в среднем около 1,5 мг/л культуральной среды.

MASP-2A (мутант Ser-Ala, описанный выше) очищали методом аффинной хроматографии на колонках с MBP-A-агарозой.

Анализ MASP-2A методом ELISA на представляющих интерес клонах scFv, идентифицированных путем пэннинга/превращения scFv и фильтрующего скрининга.

Фаговый дисплей библиотеки варибельной области легких и тяжелых цепей последовательностей человеческого иммуноглобулина подвергали антигенному пэннингу с последующим автоматизированным скринингом и селекцией антител для выявления высокоаффинных scFv антител к белку человеческой MASP-2 человека. Были проведены три раунда пэннинга библиотеки фагов scFv против HIS-меченой или биотин-меченой MASP-2A. Третий раунд пэннинга сначала элюировали с помощью MBL, а затем с помощью TEA (щелочным). Для мониторинга специфического обогащения фагов, изображающих фрагменты scFv против таргетной MASP-2A, проводили анализ поликлонального фага против иммобилизованного MASP-2A методом ELISA. Клонировали гены scFv из третьего раунда пэннинга в экспрессирующий вектор pHOG и проводили мелкомасштабный фильтрующий скрининг для поиска специфических клонов против MASP-2A.

Бактериальные колонии, содержащие плазмиды, кодирующие фрагменты scFv из третьего раунда пэннинга, отбирали, помещали на нитроцеллюлозные мембраны и выращивали в течение ночи на неиндуцирующей среде с получением шаблонов. В общей сложности были отобраны и проанализированы 18 000 колоний из третьего раунда пэннинга, половину из конкурентного элюирования и наполовину из последующего элюирования с помощью TEA. Пэннинг фагмидной библиотеки scFv против MASP-2A с последующим превращением scFv и фильтрующим скринингом давал 137 положительных клонов. Клоны 108/137 давали положительный результат в анализе связывания MASP-2 методом ELISA (данные не показаны), из которых 45 клонов подвергали дополнительному анализу на способность блокировать активность MASP-2 в сыворотке здорового человека.

Исследование по измерению ингибирования образования C3-конвертазы лектинового пути.

Функциональное исследование, в котором измеряют ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" представляющих интерес клонов scFv MASP-2. MASP-2 серин-протеаза требуется для генерации двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые включают C3-конвертазу лектинового пути. Поэтому, фрагмент Fab2 антитела против MASP-2, который ингибирует функциональную активность MASP-2 (то есть MASP-2 блокирующий scFv), будет ингибировать с самого начала образование C3-конвертазы лектинового пути. C3 содержит в качестве части своей структуры необычную и очень реакционноспособную тиозфирную группу. После расщепления C3 с помощью C3-конвертазы, тиозфирная группа в C3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминокетонами макромолекул, иммобилизованных на дне пластмассовых лунок, при помощи эфирных или амидных связей, что облегчает определение C3b при использовании метода анализа ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В описанном ниже методе измерения образования C3-конвертазы, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали с разбавленной человеческой сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и определяли C3b, иммобилизованный в лунках, используя стандартные методы ELISA. Количество C3b, генерируемое в этом анализе, является прямым отражением образования с самого начала C3-конвертазы лектинового пути. В этом исследовании, испытывали клоны фрагментов scFv против MASP-2 при выбранных концентрациях на их способность ингибировать образование C3-конвертазы и последующую генерацию C3b.

Методы.

45 представляющих интерес клонов, идентифицированных, как описано выше, экспрессировали, очищали и разбавляли до одной и той же исходной концентрации, которую снова разбавляли в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 mM барбитала, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl_2 , 2,0 mM CaCl_2 , 0,1% желатина, pH 7,4) для гарантии того, что все клоны имеют одинаковое количество буфера. Каждый из клонов scFv тестировали по три раза при концентрации 2 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали OMS100 Fab2, который подвергали испытаниям при концентрации 0,4 мкг/мл. Постоянно проводили наблюдение образования C3c в присутствии и отсутствии клонов scFv/IgG.

Маннан разбавляли до концентрации 20 мкг/мл (1 мкг/лунку) в 50 mM карбонатном буфере (15 mM Na_2CO_3 +35 mM NaHCO_3 +1,5 mM NaN_3), pH 9,5, и наносили на планшет ELISA в течение ночи при 4°C. На следующий день покрытые маннаном планшеты промывали 3 раза с помощью 200 мкл PBS. Затем в лунки добавляли 100 мкл 1% ингибирующего HSA раствора и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты три раза промывали с помощью 200 мкл PBS и хранили на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Сыворотку здорового человека разбавляли до 0,5% в буфере CaMgGVB, и клоны scFv или положительный контроль OMS100 Fab2 добавляли в трех экземплярах в этот буфер в концентрации 0,01 мкг/мл; 1 мкг/мл (только контроль OMS100) и 10 мкг/мл, и предварительно инкубировали 45 минут на льду перед добавлением к заблокированному планшету ELISA. Реакцию инициировали инкубацией в течение 1 ч при 37°C, и ее прекращали путем переноса планшетов на ледяную баню. Отложение C3b определяли с

помощью кроличьего антитела против α -мышинного СЗс, за которым следовало добавление козьей α -кроличьей HRP. Отрицательным контролем служил буфер без антител (без антител=максимальное осаждение СЗб), а положительным контролем служил буфер с EDTA (без осаждения СЗб). Фон определяли путем проведения этого же исследования, за исключением того, что лунки не содержали маннана. Фоно-вый сигнал планшетов без маннана вычитали из сигналов лунок, содержащих маннан. В качестве порогового критерия принимали половину активности нерелевантного scFv-клона (VZV) и одного буфера.

Результаты. Основываясь на пороговом критерии, было обнаружено, что в общей сложности 13 клонов блокируют активность MASP-2. Выбирали все 13 клонов, продуцирующих подавление >50% пути, и секвенировали их с получением 10 уникальных клонов. Было обнаружено, что все десять клонов имеют один и тот же подкласс легкой цепи $\lambda 3$, но три разных подкласса тяжелой цепи: VH2, VH3 и VH6. В функциональном исследовании, пять из десяти представляющих интерес клонов scFv характеризовались меньшими значениями IC_{50} , чем целевые критерии 25 нМ, при использовании 0,5% человеческой сыворотки.

Для идентификации антител с повышенной активностью, три материнских клона scFv, идентифицированные как описано выше, подвергали перетасовыванию легкой цепи. Этот процесс включал генерирование комбинаторной библиотеки, состоящей из VH каждого из материнских клонов, объединенной в пару с библиотекой интактных лямбда легких цепей (VL) человека, полученных от шести здоровых доноров. Затем эту библиотеку подвергали скринингу на клоны scFv с повышенной аффинностью связывания и/или функциональностью.

Таблица 19

Сравнение функциональной активности по величине IC_{50} (нМ) ведущих дочерних клонов и их соответствующих материнских клонов (все в формате scFv)

Клон scFv	Исследование СЗ в 1% сыворотке человека (IC_{50} нМ)	Исследование СЗ в 90% сыворотке человека (IC_{50} нМ)	Исследование С4 в 90% сыворотке человека (IC_{50} нМ)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N1 1	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

Ниже представлены последовательности переменных областей тяжелой цепи (VH) для материнских клонов и дочерних клонов, приведенных выше в табл. 19.

Гипервариабельные участки (CDR) Rabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) выделены полужирным шрифтом, а гипервариабельные участки (CDR) Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) подчеркнуты.

17D20_35VH-21N11VL переменная область тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 67, кодированная с помощью SEQ ID NO: 66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK

SYRTSLKSRILTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARIRRGIDYWGQGLTVTVSS

d17N9 переменная область тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSSTSAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW

YNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPFGVPFDIWGQGTMTVTVSS

Ниже представлены последовательности переменных областей легкой цепи (VL) для материнских клонов и дочерних клонов.

Гипервариабельные участки (CDR) Rabat (24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) выделены полужирным шрифтом, а гипервариабельные участки (CDR) Chothia (24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) подчеркнуты. Эти участки одинаковы, независимо от того, пронумерованы ли они по системе Rabat или Chothia.

17D20m_d3521N11 переменная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 70, кодированная с помощью SEQ ID NO: 69)

QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKORPSGIPE

RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL

17N16m_d17N9 переменная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPQAPVLVIYDDSDRPSGIPD

RFASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHYVFGGKTLTVLAAAGSEQKLISE

Антитела OMS100 и MoAb_d3521N11VL против MASP-2 (включающие переменную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70, называемые также как "OMS646" и "mAbH6"), по

поводу которых было обнаружено, что они связываются с человеческой MASP-2 с высоким сродством и обладают способностью блокировать функциональную активность комплемента, подвергали анализу относительно связывания эпитопа с помощью дот-блот анализа. Результаты показывают, что антитела OMS646 и OMS100 являются высокоспецифичными в отношении MASP-2 и не связываются с MASP-1/3. Антитело не связывалось ни с MAr19, ни с фрагментами MASP-2, которые не содержали CCP1-домен MASP-2, что позволяет сделать вывод, что сайты связывания включают CCP1.

Было выяснено, что антитело OMS646 против MASP-2 активно связывается с рекомбинантной MASP-2 (K_d 60-250 мкМ) с селективностью выше в 5000 раз по сравнению с C1s, C1r или MASP-1 (см. табл. 20 ниже).

Таблица 20
Аффинность и специфичность антитела OMS646 против MASP-2
при взаимодействии с MASP-2, оцененные методом твердофазного анализа ELISA

Антиген	K_d (pM)
MA SP-1	> 500000
MA SP-2	62 $\pm$ 23*
MA SP-3	> 500000
Очищенный человеческий C1r	> 500000
Очищенный человеческий C1s	~ 500000

* Среднее значение $\pm$ среднее квадратическое отклонение; n=12.

OMS646 специфически блокирует лектин-зависимую активацию конечных компонентов комплемента.

Методы.

Воздействие OMS646 на осаждение мембраноатакующего комплекса (MAC) исследовали при использовании специфических условия для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели использовали набор для скрининга комплемента Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Результаты.

На фиг. 53A графически представлен уровень осаждения MAC в присутствии или отсутствии антитела против MASP-2 (OMS646) при условиях исследования, специфичных к лектинового пути. На фиг. 53B графически представлен уровень осаждения MAC в присутствии или отсутствии антитела против MASP-2 (OMS646) при условиях исследования, специфичных к классическому пути. На фиг. 53C графически представлен уровень осаждения MAC в присутствии или отсутствии антитела против MASP-2 (OMS646) при условиях исследования, специфичных к альтернативному пути.

Как показано на фиг. 53A, антитело OMS646 блокирует опосредованную лектиновым путем активацию осаждения MAC с величиной IC_{50} приблизительно 1 нМ. Однако антитело OMS646 не влияло на осаждение MAC, генерируемое в результате активации, опосредованной классическим путем (фиг. 53B), или в результате активации, опосредованной опосредуемой альтернативным путем (фиг. 53C).

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики для антитела OMS646 после его внутривенного или подкожного введения мышам.

Фармакокинетику и фармакодинамику для антитела OMS646 изучали у мышей после однократного дозирования антитела в течение 28 дней. Для исследования использовали дозы 5 мг/кг и 15 мг/кг OMS646 подкожно, а также дозы 5 мг/кг OMS646 внутривенно.

Что касается фармакокинетического профиля OMS646, то на фиг. 54 графически представлена зависимость концентрации OMS646 (в среднем $n=3$ животных в группе) от времени после введения OMS646 в указанной дозе. Как показано на фиг. 54, при дозе 5 мг/кг подкожно, максимальной концентрация OMS646 достигала в плазме 5-6 мкг/мл приблизительно через 1-2 дня после дозирования. Биодоступность OMS646 при дозе 5 мг/кг подкожно составляла приблизительно 60%. Как дополнительно показано на фиг. 54, при дозе 15 мг/кг подкожно, максимальная концентрация OMS646 в плазме достигла 10-12 мкг/мл приблизительно через 1-2 дня после дозирования. Для всех групп, OMS646 медленно выводилось от системного кровообращения с конечным периодом полувыведения примерно 8-10 дней. Профиль OMS646 является типичным при введении человеческого антитела мышам.

Фармакодинамическая активность OMS646 графически проиллюстрирована на фиг. 55A и 55B. На фиг. 55A и 55B показан фармакодинамический ответ (снижение системной активности лектинового пути) для каждой мыши в группах с дозированием 5 мг/кг внутривенно (фиг. 55A) и 5 мг/кг подкожно (фиг. 55B). Пунктирной линией обозначен исходный уровень при исследовании (максимальное ингибирование, сыворотка интактной мыши, которой перед исследованием введен *in vitro* избыток OMS646). Как показано на фиг. 55A, после внутривенного введения 5 мг/кг OMS646, системная активность лектинового пути сразу снижалась до почти необнаруживаемых уровней, а активности лектинового пути характеризовались лишь умеренным восстановлением в течение 28 дней наблюдения. Как показано на фиг. 55B, у мышей, которым вводили дозу 5 мг/кг OMS646 подкожно, наблюдалось зависящее от времени ингиби-

рование активности лектинового пути. Активность лектинового пути снижалась до почти необнаруживаемых уровней в течение 24 ч после введения лекарственного средства и оставалась на низком уровне в течение по меньшей мере 7 дней. Активность лектинового пути постепенно повышалась со временем, но в течение 28 дней наблюдения не достигала уровня, который был до дозирования. Профиль активности лектинового пути от времени, наблюдаемый после введения дозы 15 мг/кг подкожно, был аналогичен профилю при дозе 5 мг/кг подкожно (данные не показаны), что указывает на достижение максимально возможного фармакодинамического эффекта. Кроме того, эти данные показали, что внутривенное или подкожное введение один раз в неделю дозы 5 мг/кг OMS646 достаточно для обеспечения непрерывного подавления системной активности лектинового пути у мышей.

Пример 41.

В этом примере показано, что MASP-2 ингибирующее антитело (OMS646) ингибирует индуцированное сывороткой aHUS отложение C5b-9 на поверхности активированных микроклеток эндотелия сосудов (HMEC-1) человека после воздействия сыворотки, полученной от пациентов с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), взятой во время острой фазы и фазы ремиссии заболевания.

Уровень изученности проблемы/актуальность. Следующее исследование проводили для изучения индуцированного aSUS-сывороткой осаждения C5b-9 на поверхности активированных клеток HMEC-1 после воздействия сыворотки пациентов с HUS, полученной (1) во время острой фазы, и (2) во время фазы ремиссии заболевания, в присутствии или отсутствии OMS646, антитела против MASP-2, которое специфически связывается с MASP-2 и ингибирует активацию лектинового пути.

Методы.

Пациенты. Для этого исследования отбирали четырех пациентов с aHUS, которых обследовали как во время острой фазы заболевания, так и в состоянии ремиссии, среди тех, которые включены в Международный реестр HUS/TTP (International Registry of HUS/TTP) и генотипированы в Лаборатории иммунологии и генетики трансплантации и редких заболеваний Института Марио Негри (Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute). Один пациент aHUS имел гетерозиготную мутацию p.R121°C фактора комплемента H (CFH), а один пациент имел аутоантитела против CFH, в то время как у двух других пациентов мутации или антитела к CFH не были обнаружены.

В табл. 21 и 22 обобщены результаты скрининга мутаций гена комплемента и аутоантител против CFH у четырех пациентов, обследуемых в этом исследовании, наряду с клиническими и биохимическими данными, полученными или во время острой фазы, или при ремиссии.

Таблица 21

Клинические параметры четырех пациентов с aHUS в этом исследовании

Случай №	Мутация или Ab против CFH	Фаза заболевания	Тромбоциты (150–400×10 ³ /мкл)	LDH (266–500 МЕ/л)	Гемоглобин (14–18 г/дл)	s-Креатинин (0,55–1,25 мг/дл)
#1	Нет мутаций, нет Ab против CFH	острая	31000	1396	12,9	2,37
		ремиссия	267000	n.a.	11,5	3,76
#2	CFH-R1210C	острая	46000	1962	7	5,7
		ремиссия	268000	440	13,4	7,24
#3	Ab против CFH	острая	40000	3362	9,5	1,77
		ремиссия	271000	338	8,8	0,84
#4	Нет мутаций, нет Ab против CFH	острая	83000	1219	7,8	6,8
		ремиссия	222000	495	12,2	13

Примечание: n.a. = данные отсутствуют.

Таблица 22

Параметры комплемента четырех пациентов с aHUS в этом исследовании

Случай №	Мутация или Ab против CFH	Фаза заболевания	Сыворотка C3 (83-180 мг/дл)	Plasma SC5b- 9 (127-400 нг/мл)
#1	Нет мутаций, нет Ab против CFH	острая	51	69
		ремиссия	n.a.	117
#2	CFH-R1210C	острая	79	421
		ремиссия	119	233
#3	Ab против CFH	острая	58	653
		ремиссия	149	591
#4	Нет мутаций, нет Ab против CFH	острая	108	n.a.
		ремиссия	n.a.	n.a.

Экспериментальные методы.

Клетки линии микроклеток эндотелия сосудов (НМЕС-1) человека дермального происхождения высеивали на предметных стеклах и использовали после их конфлюенции. Конфлюентные клетки НМЕС-1 активировали 10 мкМ АЦФ (аденозиндифосфата) в течение 10 минут, и затем инкубировали в течение 4 ч с сывороткой четырех пациентов с aHUS, описанных выше в табл. 23 и 24, собранной либо во время острой фазы заболевания, либо при ремиссии, или с сывороткой 4 здоровых субъектов, используемой в качестве контроля. Сыворотку разбавляли 1:2 контрольной средой (HBSS с 0,5% BSA) в присутствии или в отсутствии MASP-2 ингибирующего антитела OMS646 (100 мкг/мл), генерированного, как описано выше в примере 40, или в присутствии растворимого рецептора комплемента 1 (sCR1) (150 мкг/мл), в качестве положительного контроля при ингибировании комплемента. В конце стадии инкубации, клетки НМЕС-1 обрабатывали кроличьим антителом против человеческого комплемента C5b-9, затем FITC-конъюгированным вторичным антителом. В каждом эксперименте, сыворотку от одного контрольного здорового субъекта испытывали параллельно с сывороткой пациента aHUS (в острой фазе и ремиссии). Для регистрации флуоресцентного окрашивания на поверхности эндотелиальных клеток использовали конфокальный инвертированный лазерный микроскоп. Регистрировали 15 полей в каждом образце, и оценивали площадь флуоресцентного окрашивания с помощью автоматического обнаружения границ, используя встроенные специфические функции программного обеспечения Image J, и результаты выражали как пиксель² на анализируемое поле. Поля, характеризующиеся самым низким и самым высоким значением, не использовали для расчетов.

Для статистического анализа (однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим испытанием на критерий Тьюки для множественных сравнений) использовали результаты в пиксель² для 13 полей, полученные для каждого пациента и контрольного субъекта при каждом условии эксперимента.

Результаты.

Результаты анализа осаждения комплемента с помощью сывороток четырех пациентов с aHUS, приведены ниже в таблице 23А, а результаты с сывороткой четырех здоровых субъектов приведены ниже в таблице 23В.

Таблица 23А

Воздействие ингибиторов комплемента на осаждение C5b-9 на АДФ-активированных клетках НМЕС-1, индуцированное сывороткой пациентов с aHUS

Пациент с aHUS #	Острая фаза aHUS			Фаза ремиссии aHUS		
	Без лечения	+sCR1	+OMS646	Без лечения	+sCR1	+OMS646
Пациент #1 (нет мутации, нет ab против CFH)	5076 ± 562°	551 ± 80*	3312 ± 422**	4507 ± 533°	598 ± 101	1650 ± 223
Пациент #2 (CFH-R1210C)	5103 ± 648°	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570°	420 ± 65	2151 ± 250
Пациент #3 (ab против CFH)	3322 ± 421°	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901°	660 ± 83	2077 ± 353
Пациент #4 (нет мутации, нет ab против CFH)	4267 ± 488°	205 ± 34*	2369 ± 265**	5032 ± 594°	182 ± 29	3290 ± 552
нет ab против CFH)						

Таблица 23В

Воздействие ингибиторов комплемента на осаждение C5b-9 на АДФ-активированных клетках НМЕС-1, индуцированное сывороткой четырех контрольных здоровых субъектов (не страдающих aHUS)

Контрольный здоровый субъект #	Без лечения	+sCR1	+OMS646
Контрольный субъект # 1 (исследуемый параллельно с aHUS пациентом # 1)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
Контрольный субъект # 2 (исследуемый параллельно с aHUS пациентом # 2)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
Контрольный субъект # 3 (исследуемый параллельно с aHUS пациентом # 3)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
Контрольный субъект # 4 (исследуемый параллельно с aHUS пациентом # 4)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

Для табл. 23А и 23В: данные являются средними значениями ± SE. °P<0,001 относительно контроля; *P<0,001, **P<0,01 относительно острой фазы aHUS без лечения; P<0,001, P<0,01, P<0,05 относительно фазы ремиссии aHUS без лечения.

На фиг. 56 графически представлено ингибирующее действие антитела против MASP-2 (OMS646) и sCR1 на осаждение C5b-9 на АДФ-активированных клетки НМЕС-1, индуцированное сывороткой. На фиг. 56, данные являются средними значениями ± SE. °P<0,0001 относительно контроля; *P<0,0001 относительно острой фазы aHUS; ^P<0,0001 относительно острой фазы aHUS+sCR1; P<0,0001 относительно фазы ремиссии aHUS без лечения и #P<0,0001 относительно фазы ремиссии aHUS+sCR1.

Как показано в табл. 23А, 23В и на фиг. 56, АДФ-активированные клетки НМЕС-1, подвергавшиеся воздействию сыворотки пациентов с HUS (собранных либо в острой фазе, либо в состоянии ремиссии) в течение 4 ч в статических условиях, характеризовались интенсивным осаждением C5b-9 на клеточной поверхности, обнаруживаемым конфокальной микроскопией. При измерении площади, покрытой C5b-9, было обнаружено значительно большее количество осажденного C5b-9 на клетках, подвергавшихся воздействию сыворотки пациентов с HUS, чем на клетках, подвергавшихся воздействию сыворотки контрольных здоровых субъектов, независимо от того, была ли сыворотка aHUS собрана в острой фазе или в фазе ремиссии. Не обнаруживалось никакой разницы в отложениях C5b-9 на эндотелии, индуцированных сывороткой, собранной в период острой фазы и фазы ремиссии aHUS.

Кроме того, как показано в табл. 23А, 23В и на фиг. 56, добавление антитела OMS646 против MMSP-2 к сыворотке aHUS (полученной у пациента либо во время острой фазы, либо в фазе ремиссии) приводило к значительному уменьшению осаждения C5b-9 на поверхности эндотелиальных клеток по сравнению с необработанной сывороткой aHUS. Однако ингибирующее действие OMS646 на осаждение C5b-9 было менее глубоким, чем эффект, оказываемый ингибитором комплемента широкого действия sCR1. И действительно, наблюдалось статистически значимое различие между C5b-9 отложениями под воздействием aHUS сыворотки в присутствии OMS646 по сравнению с присутствием sCR1 (фиг. 56 и табл. 23А и 23В).

При расчете среднего значения для четырех пациентов с aHUS, наблюдаемые в присутствии ингибиторов комплемента проценты уменьшения отложений C5b-9 (по сравнению с отложениями C5b-9, индуцированными необработанной сывороткой тех же пациентов, принимаемыми за 10 0%), были следующими:

Острая фаза:

sCR1 (150 мкг/мл): 91% уменьшение отложений C5b-9.

OMS646 (100 мкг/мл): 40% уменьшение отложений C5b-9.

Фаза ремиссии:

sCR1 (150 мкг/мл): 91% уменьшение отложений C5b-9.

OMS646 (100 мкг/мл): 54% уменьшение отложений C5b-9.

Выводы.

Результаты, представленные в этом примере, показывают, что лектиновый путь комплемента стимулируется активированными микроклетками эндотелия сосудов, и что эта стимуляция является важным сигналом для ответной избыточной активации комплемента, характерной для aHUS. Также показано, что эта стимуляция лектинового пути и, как следствие, ответная избыточная активация комплемента возникает как во время острой фазы, так и в фазе клинической ремиссии aHUS. Более того, по-видимому, что этот вывод не ограничивается только каким-либо конкретным дефектом комплемента, связанным с aHUS. Кроме того, как показано в этом примере, селективное ингибирование лектинового пути с помощью MASP-2 ингибирующего антитела, такого как OMS646, уменьшает осаждение комплемента у пациентов HUS с различной этиологией.

Пример 42.

В этом примере показано, что MASP-2 ингибирующее антитело (OMS64 6) ингибирует индуцированную сывороткой агрегацию тромбоцитов и тромбообразование на поверхности активированных человеческих микроклеток эндотелия сосудов (НМЕС-1) после воздействия сыворотки пациента HUS, полученной (1) во время острой фазы и (2) во время фазы ремиссии aHUS.

Методы.

Пациенты. Обследовали три пациента (пациенты #1, #2 и #4, описанные в табл. 21, 22, 23А и 23В в примере 41), страдающих aHUS (у одного пациента была обнаружена гетерозиготная мутация p.R121°С CFH, у двух других пациентов были обнаружены мутация или антитела против CFH) как во время острой фазы заболевания, так и в фазе ремиссии. Для этого исследования отбирали четырех пациентов среди тех, которые включены в Международный реестр HUS/TTP (International Registry of HUS/TTP) и генотипированы в Лаборатории иммунологии и генетики трансплантации и редких заболеваний Института Марио Негри (Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute). В качестве доноров крови для перфузионных экспериментов были также отобраны пять здоровых субъектов.

Методы. Конфлюентные клетки НМЕС-1 активировали с помощью 10 мкМ АДФ в течение 10 минут, и затем инкубировали в течение 3 ч с сывороткой трех пациентов с aHUS (пациенты #1, #2 и #4, описанные в примере 41), собранной либо во время острой фазы заболевания, либо при ремиссии, или с контрольной сывороткой здоровых субъектов. Сыворотку разбавляли 1:2 контрольной средой (HBSS с 0,5% BSA) в присутствии или в отсутствии MASP-2 ингибирующего антитела OMS646 (100 мкг/мл), генерированного, как описано выше в примере 40, или в присутствии sCR1 (150 мкг/мл), в качестве положительного контроля при ингибировании комплемента. В случае пациентов #1 и #2, дополнительные лунки инкубировали с сывороткой (острой фазы и ремиссии), разведенной 1:2 контрольной средой, содержащей 100 мкг/мл нерелевантного изотипного контрольного антитела или 20 мкг/мл OMS646 (для последнего антитела, в случае пациента #1 испытания проводили с сывороткой только в фазе ремиссии, а

в случае # 2 - как во время острой фазы, так и в фазе ремиссии).

В конце стадии инкубации, клетки НМЕС-1 перфузировали в проточной камере с помощью цельной гепаринизированной крови (10 МЕ/мл), полученной от здоровых субъектов (содержащей флуоресцентный краситель мекакрин, который метит тромбоциты), при сдвиговом напряжении, характерном для микроциркуляции (60 дин/см², три минуты). После трех минут перфузии, монослои клеток эндотелия фиксировали в ацетоне. Регистрировали пятнадцать изображений для каждого образца тромбоцитарного тромба на поверхности эндотелиальных клеток с помощью конфокального инвертированного лазерного микроскопа, и оценивали области, занятые тромбами, с использованием программного обеспечения Image J. Поля, характеризующиеся самым низким и самым высоким значением, не использовали для расчетов.

Для статистического анализа (однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим испытанием на критерий Тьюки для множественных сравнений) использовали результаты в пиксель² для 13 полей, полученные для каждого пациента и контрольного субъекта при каждом условии эксперимента.

Результаты.

Результаты экспериментов по тромбообразованию с сыворотками трех пациентов с aHUS приведены ниже в табл. 24А, а результаты с сыворотками пяти здоровых субъектов приведены ниже в табл. 24В.

Таблица 24А

Воздействие ингибиторов комплемента на тромбообразование (пиксель²±SE), индуцированное сывороткой aHUS, на клетках НМЕС-1, активированных АДФ

Условия эксперимента	Стадия заболевания	Случай #1 aHUS тромбообразование (пиксель ² ±SE) (не мутации, нет аб против CFH)	Случай #2 aHUS тромбообразование (пиксель ² ±SE) (CFH-R1210C)	Случай #3 aHUS тромбообразование (пиксель ² ±SE) (не мутации, нет аб против CFH)
без обработки	острая	5499±600	22320±1273°	10291±1362°
	ремиссия	6468±1012°	3387±443°	17676±1106°
+sCR1 (150 мкг/мл)	острая	4311±676	5539±578*	5336±1214***
	ремиссия	573±316	977±102	2544±498
+OMS646 (20 мкг/мл)	острая	не определяли	6974±556*	не определяли
	ремиссия	832±150	1224±252	не определяли
+OMS646 (100 мкг/мл)	острая	3705±777	9913±984*	2836±509*
	ремиссия	3321±945	733±102	1700±321
+нерелевантное изотипное контрольное антитело (100 мкг/мл)	острая	5995±725	18655±1699	не определяли
	ремиссия	10885±1380	2711±371	не определяли

Таблица 24В

Воздействие ингибиторов комплемента на сыворотку пяти контрольных здоровых субъектов (не страдающих от HUS) при исследовании тромбообразования (пиксель²±SE) на клетках НМЕС-1, активированных АДФ

Условия эксперимента	Контроль # 1 тромбо- образо- вание (пиксель ² ±SE)	Контроль # 2 тромбо- образо- вание (пиксель ² ±SE)	Контроль # 3 тромбо- образо- вание (пиксель ² ±SE)	Контроль # 4 тромбо- образо- вание (пиксель ² ±SE)	Контроль # 5 тромбо- образо- вание (пиксель ² ±SE)
без обработки	2880±510	1046±172	1144±193	735±124	2811±609
+sCR1 (150 мкг/мл)	5192±637	1527±153	1198±138	2239±243	2384±410
+OMS646 (100 мкг/мл)	7637±888	1036±175	731±203	2000±356	7177±1477
+нереле- вантное изотипное контрольное антитело (100 мкг/мл)	6325±697	1024±235	399±82	45269	не определяли
Исследовано параллельно с сывороткой субъекта с aHUS	#1 (сыво- ротка острой фазы)	#1 (сыво- ротка фазы ремиссии)	#2 (сыво- ротка острой фазы)	#2 (сыво- ротка фазы ремиссии)	#5 (сыво- ротка острой фазы и фазы ремиссии)

Для табл. 24А и 24В: данные являются средними значениями ± SE. °P<0,001 относительно контроля; *P<0,001, ***P<0,05 относительно острой фазы aHUS без обработки; P<0,001, P<0,05 относительно фазы ремиссии aHUS без обработки.

На фиг. 57 графически представлено воздействие антитела против MASP-2 (OMS646) и sCR1 на индуцированное сывороткой тромбообразование на АДФ-активированных клетках НМЕС-1. На фиг. 57, приведенные данные представляют собой средние значения ± SE. °P 0,0001, °°P<0,01 против контроля; *P<0,0001, **P<0,01 против острой фазы HUS без обработки; P<0,0001 против фазы ремиссии aHUS без обработки.

Как показано в табл. 24А и на фиг. 57, заметное увеличение площади, покрываемой тромбами, наблюдалось на клетках НМЕС-1, обработанных сывороткой aHUS, собранной либо во время острой фазы, либо при ремиссии, по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию сыворотки контрольных здоровых субъектов (табл. 24В и фиг. 57). Как показано на фиг. 57 и в табл. 24А, антитело OMS646 (при 100 мкг/мл и 20 мкг/мл) оказывало частичное ингибирование тромбообразования на клетках, предварительно подвергнутых воздействию сыворотки aHUS, взятой во время острой фазы. Антитромбогенный эффект был сопоставим для двух различных доз OMS646 и не отличался от эффекта sCR1 (фигура 57 и табл. 24А). Добавление нерелевантного изотипного контрольного антитела не оказывало ингибирующего действия на тромбообразование, индуцированное aHUS.

Кроме того, как показано на фиг. 57 и в табл. 24А, ингибирующее действие OMS646 было еще более очевидным в случае сыворотки aHUS, собранной во время фазы ремиссии. И действительно, добавление OMS646 в дозах 100 мкг/мл и 20 мкг/мл к сыворотке пациента aHUS, собранной в фазе ремиссии, приводило к почти полному ингибированию тромбообразования, аналогичному ингибированию, наблюдаемому при добавлении sCR1. Нерелевантное изотипное контрольное антитело не проявляло существенного ингибирующего эффекта.

При расчете среднего значения для трех пациентов с aHUS, наблюдаемые в присутствии ингибиторов комплемента проценты уменьшения площади поверхности клеток НМЕС-1, покрытой отложениями тромбов (по сравнению с площадью, покрытой отложениями тромбов, вызванными необработанной сывороткой тех же пациентов, принимаемой за 100%), были следующими.

Острая фаза:

sCR1 (150 мкг/мл): 60% уменьшение.

OMS646 (100 мкг/мл): 57% уменьшение.

OMS646 (20 мкг/мл): 45% уменьшение.

Этап ремиссии:

sCR1 (150 мкг/мл): 85% уменьшение.

OMS646 (100 мкг/мл): 79% уменьшение.

OMS646 (20 мкг/мл): 89% уменьшение.

Обсуждение результатов.

Полученные в этом примере результаты показывают, что MASP-2 ингибирующее антитело, такое как OMS646 (генерируемое как описано в примере 40), оказывает сильное ингибирующее действие на индуцированное сывороткой тромбообразование на HMEC-1. Удивительно, но ингибирующее действие антитела OMS646 на тромбообразование было большим, чем его воздействие на отложения C5b-9, индуцированные на HMEC-1 (как описано в примере 41). Также удивительно, что добавление OMS646 в дозах 100 мкг/мл и 20 мкг/мл к сыворотке пациента с aHUS, собранной при ремиссии, приводило к почти полному ингибированию тромбообразования. Другим неожиданным результатом является наблюдение того, что OMS646 как в острой фазе, так и в ремиссии, был также эффективен, как положительный контроль sCR1, который является ингибитором широкого действия и почти полным ингибитором системы комплемента (Weisman H. et al., Science 249: 146-151, 1990; Lazar H. et al., Circulation 100: 1438-1442, 1999).

Следует отметить, что контрольная сыворотка здоровых субъектов также вызывала умеренное тромбообразование на клетках HMEC-1. Не было обнаружено устойчивого ингибирующего эффекта на тромбообразование, индуцированное контрольной сывороткой, ни в случае OMS646, ни в случае sCR1. Не приводя для подтверждения какой-либо конкретной теории, тем не менее, можно предположить, что индуцированные контрольной сывороткой тромбы не зависят от комплемента, что подтверждается очень низкими уровнями отложений C5b-9, обнаруживаемыми на клетках HMEC-1, инкубированных с контрольной сывороткой (см. пример 41).

Выводы.

В заключение необходимо отметить, что наблюдаемое антитромботическое действие MASP-2 ингибирующего антитела, такого как OMS646, оказывается значительно более высоким, чем можно было ожидать, основываясь на ингибирующем действии OMS646 на осаждение C5b-9, наблюдаемом в этой экспериментальной системе (как описано в примере 41 и показано на фиг. 56). Например, в публикации Gastoldi et al., Immunobiology 217: 1129-1222 Abstract 48 (2012), озаглавленной "C5a/C5aR-взаимодействие опосредует активацию комплемента и тромбоз на эндотелиальных клетках при атипичном гемолитическом уремическом синдроме (aHUS)", было установлено, что добавление антитела против C5, ингибирующего отложения C5b-9 (уменьшение на 60%), ограничивало тромбообразование на клетках HMEC-1 в сопоставимой степени (уменьшение на 60%). В отличие от этого, MASP-2 ингибирующее антитело (OMS646 при 100 мкг/мл) ингибировало отложения C5b-9 с достаточно средними значениями (острая фаза=уменьшение на 40%, фаза ремиссии=уменьшение на 54%) и ингибировало тромбообразование при существенно более высоком проценте (острая фаза=уменьшение на 57%, фаза ремиссии=уменьшение на 79%). Для сравнения, антитело OMS646 ингибировало осаждение комплемента с более низким процентом, чем ингибитор комплемента для положительного контроля (sCR1 при 150 мкг/мл, ингибирование осаждения C5b-9 в острой фазе=91%, в фазе ремиссии=91%), но оно было также эффективно, как и sCR1-положительный контроль при ингибировании тромбообразования (sCR1 при 150 мкг/мл, острая фаза=уменьшение на 60%, фаза ремиссии=уменьшение на 85%). Эти результаты показывают, что MASP-2 ингибирующее антитело (например, OMS646) проявляет неожиданную эффективность при ингибировании тромбообразования в сыворотке крови, полученной от субъектов с aHUS, как в острой фазе, так и в фазе ремиссии.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии (ТМА) или подверженного риску развития, тромботической микроангиопатии (ТМА), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ТМА выбирают из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) и атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). В одном варианте осуществления ТМА представляет собой aHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время острой фазы заболевания. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время фазы ремиссии (то есть у субъекта, который восстановился или частично восстановился после эпизода острой фазы aHUS, такая ремиссия подтверждается, например, увеличением количества тромбоцитов и/или пониженными концентрациями лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке, например, как описано в публикации Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело характеризуется, по меньшей мере, одной или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с величиной K_D 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в CCP1 домене MASP-2, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в исследовании *in vitro* в 1% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть ингибирует лектиновый путь, оставляя незатронутым классический и альтернативный путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови субъекта, страдающего от ТМА, такой как aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), по мере, на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90% и вплоть до 99%, по сравнению с необработанной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови субъекта, страдающего от aHUS, на уровне, по меньшей мере, на 20 процентов или более (например по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) превышающем ингибирующее действие на осаждение C5b-9 в сыворотке крови.

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови пациента с aHUS в фазе ремиссии по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% и вплоть до 99%, по сравнению с сывороткой, необработанной антителом. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови пациента с aHUS в фазе ремиссии на уровне, по меньшей мере, на 20 процентов или выше (например по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) больше, чем ингибирующий эффект в отношении осаждения C5b-9 в сыворотке крови.

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

В одном варианте осуществления изобретение предлагает способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТМА, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, включающую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, включающую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, включающую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, включающую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, включающую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, включающую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67) и вариабельную область легкой цепи по меньшей мере, с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

В одном варианте выполнения, ТМА выбирают из группы, состоящей из атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) (либо в острой фазе, либо в фазе ремиссии), HUS и TTP. В одном варианте осуществления субъект находится в острой фазе aHUS. В одном варианте осуществления объект находится в стадии ремиссии aHUS.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего вариабельную область тяжелой цепи, включающую в себя аминокислотную последовательность,

обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемого контрольным антителом OMS646, включающим переменную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70. Конкуренцию между участниками связывания можно легко исследовать *in vitro*, например, используя метод анализа ELISA и/или путем введения метки в виде специфической репортерной группы в один из участников связывания, который может быть обнаружен в присутствии другого меченого участника (участников) связывания, для того чтобы обеспечить возможность идентификации специфических участников связывания, которые связывают один и тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп. Таким образом, в настоящем изобретении предлагается специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие антигенсвязывающий сайт человеческого антитела, который конкурирует с контрольным антителом OMS646 при связывании с человеческой MASP-2.

Пример 43.

В этом примере показано, что MASP-2 ингибирующее антитело человека (OMS646) способно ингибировать у TMA пациентов опосредованное плазмой индуцирование апоптоза в первичных человеческих микроклетках эндотелия сосудов (MVEC) дермального происхождения.

Уровень изученности проблемы/актуальность.

Известно, что патофизиология TMA включает повреждение эндотелиальных клеток, вызванное различными факторами, за которым следуют окклюзия мелких сосудов (например, мелких артериол и капилляров) тромбоцитарными пробками и/или фибриновыми тромбами (Hirt-Minkowsk P. et al., *Nephron Clin Practice* 114: c219-c235, 2010; Goldberg RJ et al., *Am J Kidney Dis* 56 (6): 1168-1174, 2010). Было показано, что микроклетки эндотелия сосудов (MVEC) подвергаются апоптозному повреждению при *in vitro* воздействии на них плазмы пациентов с TMA-связанными нарушениями (см. Stefanescu et al., *Blood* Vol 112 (2): 340-349, 2008; Mitra D. et al., *Blood* 89: 1224-1234, 1997). Связанное с TMA апоптозное повреждение было обнаружено в микроклетках эндотелия сосудов (MVEC), полученных из биоптатов ткани (кожи, костей, костного мозга, селезенки, почек, подвздошной кишки) таких пациентов. Было также показано, что апоптозные поражения MVEC снижают уровни связанных с мембранами регуляторных белки комплемента в микроклетках эндотелия сосудов (MVEC) (см. например, Mold & Morris, *Immunology* 102: 359-364, 2001; Christmas et al., *Immunology* 119: 522, 2006).

Считается, что цикл положительной обратной связи, включающий терминальные компоненты комплемента, вовлечен в патофизиологию TMA, включающую атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), и TMA, связанные с катастрофическим антифосфолипическим синдромом (CAPS), болезнью Дегоса и TMA на фоне рака, противораковой химиотерапии, аутоиммунной реакции и трансплантации, причем известно или считается, что каждое из этих состояний восприимчиво к анти-C5 терапии с использованием моноклонального антитела (mAb) экулизумаба (Chapin J. et al., *Brit. J. Haematol* 157: 772-774, 2012; Tsai et al., *Br J Haematol* 162 (4): 558-559, 2013; Magro C. M. et al., *Journal of Rare Diseases* 8: 185, 2013).

Проводили описанный далее эксперимент по исследованию способности ингибирующего антитела против человеческой MASP-2 (OMS646) блокировать у пациентов, страдающих от TMA, индуцированный плазмой апоптоз в первичных человеческих дермальных микроклетках эндотелия сосудов (MVEC) в образцах плазмы, полученных от пациентов, страдающих от HUS, от связанной с дефицитом ADAMTS13 тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP), от катастрофического антифосфолипического синдрома (CAPS) и системной болезни Дегоса, а также от TMA на фоне рака, трансплантации, аутоиммунного заболевания и химиотерапии.

Методы.

Проводили *in vitro* исследование эффективности MASP-2 ингибирующего антитела (OMS646) при блокировании у пациентов с TMA опосредованное плазмой индуцирование апоптоза в первичных человеческих микроклетках эндотелия сосудов (MVEC) дермального происхождения, как описано в публикации Stefanescu R. et al., *Blood* Vol 112 (2): 340-349, 2008, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Используемые в этом исследовании образцы плазмы получали из коллекции плазмы контрольных здоровых субъектов и пациентов с тромботической микроангиопатией, либо в острой фазе, либо в фазе выздоровления. Присутствие микроангиопатии у пациентов с TMA оценивали путем обнаружения шистоцитов в мазке периферической крови. Кроме того, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) диагностировали, как описано в публикации Stefanescu R. et al., *Blood* Vol 112 (2): 340-349, 2008.

Культура эндотелиальных клеток (EC).

Описанные в публикации Stefanescu et al. первичные человеческие микроклетки эндотелия сосудов

(MVEC) дермального происхождения были поставлены фирмой ScienCell Research Labs (San Diego, CA). MVEC экспрессировали CD34 с использованием пассажей 5 и 6 (Blood 89:1224-1234, 1997). MVEC содержали в полистирольных матрасах, покрытых 0,1% желатином в воде, в среде ECM1001 (ScienCell Research Labs), содержащей добавку для роста эндотелиальных клеток, пенициллин, стрептомицин и 15% фетальную бычью сыворотку. Все микроклетки эндотелия сосудов (MVEC) использовали в пассажах с 2 по 6. Пассажи включали воздействие 0,25% трипсин-EDTA в течение от 5 до 10 мин.

Апоптоз.

Типичные первичные человеческие микроклетки эндотелия сосудов (MVEC) кожного происхождения, по поводу которых было известно, что они восприимчивы к апоптозу, индуцированному TTP/HUS-плазмой, промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) и высевали в 12-луночных планшетах, покрытых 0,1% желатином в воде при $0,15 \times 10^6$ жизнеспособных клетках/мл. Посеянные клетки MVEC выдерживали в полной среде в течение 24 ч, и затем подвергали воздействию различных концентраций (от 2% до 20% по объему) образцов плазмы пациентов с ТМА или здоровой донорской плазмы в течение 18 ч в присутствии или отсутствии моноклонального антитела (mAb) против MASP-2 OMS646 (150 мкг/мл), и клетки затем собирали путем обработки трипсином. Каждый образец плазмы пациента с ТМА исследовали в двух параллельных экспериментах. Степень апоптоза, опосредованного плазмой, оценивали путем окрашивания пропидиум йодидом (PI), анализа $> 5 \times 10^3$ клеток в цитофлуорографе и по пикам АО, определяемых с помощью программного обеспечения (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Проводили также количественное определение в клеточном лизате фрагментов ДНК, связанных с цитоплазматическим гистоном, с помощью фермент-связанного иммуносорбентного исследования (ELISA) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Результаты.

Результаты исследования апоптоза микроклеток эндотелия сосудов (MVEC), индуцированного плазмой пациента с ТМА, в присутствии моноклонального антитела (mAb) против MASP-2 (OMS646) приведены ниже в табл. 25.

Таблица 25

Плазма пациента с ТМА, подвергнутая испытаниям на первичных человеческих микроклетках эндотелия сосудов (MVEC) дермального происхождения в присутствии моноклонального антитела (mAb) против MASP-2 (OMS646)

Субъект #	Возраст/ Пол	Клинический диагноз (ТМА) и другие состояния	МАСР-2 нг/мл	Диагноз на основе Cre/LDH	C5a	SC5-b9	ADAMS активность	Диагноз на основе ADAMS активности	Защита с помощью OMS646
#2	41/f	TTP	174	TTP	34,4 2	772	30%	aHUS	эффект
#3	52/f	TTP	150	TTP	48,3 2	1399	70%	aHUS	нет эффекта
#4	20/m	TTP	224	TTP	36,9	1187	<10%	TTP	эффект
#10	60/f	TTP	175, 4	TTP	49,5	4406	64%	aHUS	нет эффекта
#11	59/f	TTP	144, 9	TTP	40,3	1352	<10%	TTP	нет эффекта
#13	49/f	HUS, рак, TTP	142, 8	TTP	48,6	3843	86%	aHUS	нет эффекта

#42	27/m	ТТР	341, 5	ТТР	100, 0	5332	<5%	ТТР	нет эффекта
#46	25/f	ТТР, болезнь Дегоса, SLE	225, 1	ТТР	53,9	3426	ND	ND	эффект
#48	53/f	ТТР, SLE, нефрит после транспла нтации почки	788, 5	aHUS	31,2	1066	66%	aHUS	эффект
#49	64/f	ТТР, APLAS, CVA	494, 5		35,4	2100	ND	ND	эффект
#51	25/f	aHUS, APLAS	313, 1	ТТР	26,8	1595	23%	aHUS	эффект
#52	56/f	aHUS, SLE	333, 1	ТТР	18,9	1103	97%	aHUS	нет эффекта
#53	56/f	aHUS ремиссия	189, 9	ТТР реми ссия	28,6 9	344	74%	aHUS	нет эффекта

Условные сокращенные обозначения, используемые в табл. 25:

"APLAS"=антифосфолипидные антитела, связанные с катастрофическим антифосфолипидным синдромом (CAPS).

"SLE"=системная красная волчанка.

"CVA"=острое нарушение мозгового кровообращения (инсульт).

В соответствии с результатами, опубликованными в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2): 340-349, 2008, наблюдался значительный апоптоз первичных микроклеток эндотелия сосудов (MVEC) дермального происхождения в присутствии тринадцати образцов плазмы пациентов с ТМА в отсутствие антитела против MASP-2. Проходили параллельные испытания контрольных образцов плазмы здоровых людей, и они не вызывали апоптоза первичных микроклеток эндотелия сосудов (MVEC) (данные не показаны). Как показано в табл. 25, MASP-2 ингибирующее моноклональное антитело mAb (OMS646) ингибировало опосредованный плазмой пациентов с ТМА апоптоз первичных микроклеток эндотелия сосудов (MVEC) ("эффект" в табл. 25) в 6 из 13 испытуемых образцов плазмы пациента (46%). В частности, следует отметить, что MASP-2 ингибирующее моноклональное антитело mAb (OMS646) ингибировало апоптоз в плазме, полученной от пациентов, страдающих от HUS, ТТР, болезни Дегоса, SLE, трансплантата и APLAs (CAPS). Принимая во внимание тот факт, что в семи образцах плазмы пациентов, подвергнутых этому исследованию, моноклональное антитело (mAb) против MASP-2 не блокировало апоптоз ("нет эффекта" в табл. 25), следует отметить, что апоптоз может индуцироваться по нескольким путям, не все из которых являются зависимыми от комплемента. Например, как отмечено в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2): 340-349, 2008, апоптоз при исследовании эндотелиальных клеток (EC) зависит от базального состояния активации ЕС, на которое влияют плазматические факторы, которые могут играть некоторую роль в определении уровня повреждения, необходимого для индуцирования апоптоза. Кроме того, как отмечено в публикации Stefanescu R. et al., в плазме пациента с ТМА могут присутствовать дополнительные факторы, способные модулировать апоптоз, такие как цитокины и различные компоненты системы комплемента. Поэтому, вследствие этих осложняющих факторов, не является неожиданным тот факт, что антитело против MASP-2 не оказывало блокирующего действия во всех образцах плазмы, в которых проявлялся апоптоз, индуцированный плазмой пациентов с ТМА.

Кроме того, в связи с этим необходимо отметить, что проводилось аналогичное исследование апоптоза, индуцированного плазмой пациентов с ТМА, в присутствии антитела против C5 экулизумаба, и были получены очень похожие результаты (см. Chapin et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract #3342, 120: 2012). Клиническая эффективность экулизумаба, очень успешного коммерческого продукта, оказывается выше, чем эффективность, продемонстрированная в этой модели, что позволяет предположить, что в этой модели *in vitro* может недооцениваться клиническая эффективность лекарственных средств, ингибирующих комплемент.

Эти результаты показывают, что MASP-2 ингибирующее антитело, такое как OMS646, эффективно

ингибирует апоптоз, индуцированный плазмой, полученный от пациентов, страдающих TMA, таких как aHUS, TTP, болезнь Дегоса, SLE, трансплантат и APLAs (CAPS). Известно, что повреждение эндотелия и апоптоз играют ключевую роль в патологии TMA, такой как идиопатическая TTP и спорадический HUS (Kim et al., *Microvascular Research* vol 62 (2): 83-93, 2001). Как описано в публикации Dang et al., *Blood* 93 (4): 1264-1270, 1999, апоптоз обнаруживался в красной пульпе селезенки пациентов с TTP, но не у здоровых контрольных субъектов. Доказательства апоптоза также обнаруживались в клетках почечных клубочков MVEC-происхождения у пациента с HUS (Arends M. J. et al., *Hum Pathol* 20:89, 1989). Следовательно, можно предполагать, что введение MASP-2 ингибирующего средства, такого как MASP-2 ингибирующее антитело (например, OMS646), может стать эффективной терапией для пациентов, страдающих от TMA, такой как aHUS, TTP или другое микроангиопатическое расстройство, такое как другая форма TMA, включающая CAPS, системную болезнь Дегоса и TMA на фоне рака, TMA на фоне химиотерапии или TMA на фоне трансплантации.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ ингибирования повреждения эндотелиальных клеток и/или апоптоз эндотелиальных клеток, и/или тромбообразования у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии (TMA) или подверженного риску развития тромботической микроангиопатии (TMA), включающий введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления TMA выбирают из группы, состоящей из атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), тромботической тромбоцитопенической пурпury (TTP) и гемолитического уремического синдрома (HUS). В одном варианте осуществления TMA представляет собой aHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время острой фазы заболевания. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время фазы ремиссии (то есть субъекту, который восстановился или частично восстановился после эпизода острой фазы aHUS, и такая ремиссия подтверждается, например, увеличением количества тромбоцитов и/или снижением содержания LDH в сыворотке, например, как описано в публикации Loirat C et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее).

В одном варианте осуществления субъект страдает от TMA или подвержен риску развития TMA, которая является (i) TMA на фоне рака; (ii) TMA на фоне химиотерапии; или (iii) TMA на фоне трансплантации (например, трансплантации органов, такой как трансплантация почки или трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток). В одном варианте осуществления субъект страдает от синдрома Апшо-Шульмана (USS) или подвержен риску развития синдрома Апшо-Шульмана (USS). В одном варианте осуществления субъект страдает от болезни Дегоса или подвержен риску развития болезни Дегоса. В одном варианте осуществления субъект страдает от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS) или подвержен риску развития катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS).

В соответствии с любым из раскрытых в изобретении вариантов осуществления, MASP-2 ингибирующее антитело характеризуется, по мере, одной или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с K_D 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в CCP1 домене MASP-2, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в анализе *in vitro* в 1% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 30 нМ или менее, где антитело является фрагментом антитела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)2 и F(ab')2, где антитело является одноцепочечной молекулой, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P, и/или где антитело практически не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь (то есть ингибирует лектиновый путь, оставляя незатронутым классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует индуцированный плазмой апоптоз микроклеток эндотелия сосудов (MVEC) в сыворотке крови субъекта, страдающего от TMA, такой как aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), гемолитический уремический синдром (HUS), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), TMA на фоне рака, TMA на фоне химиотерапии; TMA на фоне трансплантации (например, трансплантации органов, например, трансплантации почек или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке крови субъект, страдающего от синдром Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке крови субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS), где индуцированный плазмой апоптоз микроклеток эндотелия сосудов (MVEC) ингибируется, по меньшей мере, на 5%, например по меньшей мере на 10%, например по меньшей мере на 20%, например по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 60%, например по

меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере, от 95% до 99%, по сравнению с сывороткой, необработанной антителом. В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует тромбообразование в сыворотке крови субъекта, страдающего от ТМА (например, такой как aHUS (в острой фазе или фазе ремиссии), гемолитический уремический синдром (HUS), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), ТМА на фоне рака, ТМА на фоне химиотерапии, ТМА на фоне трансплантации (например, трансплантации органов, такой как трансплантация почки или трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке крови субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке крови субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS)), на уровне по меньшей мере, на 20 процентов или более (например, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%) выше, чем ингибирующее действие на осаждение C5b-9 в сыворотке крови.

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

В одном варианте осуществления изобретения предлагается способ ингибирования тромбообразования у субъекта, страдающего от ТМА (например, aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), ТМА на фоне рака, ТМА на фоне химиотерапии, ТМА на фоне трансплантации (например, трансплантации органов, такой как трансплантация почек или трансплантация гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке крови субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке крови субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS)), включающий введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие (I) (a) вариативную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариативную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70 или (II) его вариант, включающий вариативную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67) и вариативную область легкой цепи по меньшей мере, с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

В одном варианте осуществления субъект страдает от ТМА, выбранной из группы, состоящей из ТМА на фоне рака, ТМА на фоне химиотерапии, ТМА на фоне трансплантации (например, трансплантации органов, такой как, трансплантация почек или трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), синдрома Апшо-Шульмана (USS), болезни Дегоса и катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие вариативную область тяжелой цепи, включающую в себя аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие вариативную область легкой цепи, включающую в себя аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемого контрольным антителом OMS646, включающим вариативную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67 и вариативную области легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

Пример 44.

В этом примере описываются начальные результаты проводимого клинического испытания в фазе 2 с целью оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего антитела против MASP-2 у взрослых пациентов с тромботическими микроангиопатиями (ТМА).

Уровень изученности проблемы.

Тромботические микроангиопатии (ТМА) представляют собой семейство редких, изнуряющих и опасных для жизни нарушений, характеризующихся образованием чрезмерного количества тромбов (сгустков) агрегатов тромбоцитов - в капиллярном кровообращении органов тела, обычно в почках и головном мозге.

Методы.

Первый этап открытого клинического испытания фазы 2 проводили на пациентах с первичным атипичным гемолитическим уремическим синдромом (аHUS), с резистентным к плазмотерапии аHUS и с тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП). В этом клиническом испытании второй фазы не применяют плацебо, учитывая опасный для жизни характер заболевания.

Подвергали скринингу субъектов в возрасте ≥ 18 лет, и в это исследование включали только тех субъектов, у которых было диагностировано одного из следующих ТМА:

1) Первичный аHUS, диагностированный клинически и имеющий активность ADAMTS13 $> 10\%$ в плазме. Подходящими являются пациенты с документированной мутацией в комплементе или без мутации, или с наличием антитела против CFH. Пациентов классифицируют в соответствии с их ответной реакцией на плазмотерапию (замещение плазмы или инфузию плазмы):

о резистентные к плазмотерапии пациенты с аHUS, для целей данного исследования удовлетворяют всем следующим требованиям:

(а) скрининг количества тромбоцитов $< 150000/\text{мкл}$, несмотря на то, что до скрининга проводилось четыре сеанса плазмотерапии;

(б) доказательства микроангиопатического гемолиза (присутствие шизоцитов, содержание лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке выше верхнего предела нормы (ULN), гаптоглобин $< \text{LLN}$);

и

(с) содержание креатинина в сыворотке $> \text{ULN}$.

пациенты с аHUS, восприимчивые к продолжительной плазмотерапии (чувствительные к плазмотерапии), которым может потребоваться, по меньшей мере, применение плазмотерапии один раз в неделю в течение четырех недель до введения первой дозы OMS646 при содержании креатина в сыворотке $> \text{ULN}$.

2) ТТП определяется всеми следующими показателями:

количество тромбоцитов $< 150000/\text{мкл}$;

доказательства микроангиопатического гемолиза (присутствие шизоцитов, содержание лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке $> \text{ULN}$, гаптоглобин $\leq \text{LLN}$); и

активность ADAMTS13 $\leq 10\%$ во время текущего приступа ТТП или постоянно.

Примечание: субъектов исключали из исследования, если их подвергали терапии с экулизумабом в течение трех месяцев до скрининга. Критерии для пациента, классифицируемого как резистентного к плазмотерапии, использовали для определения приемлемости его участия в этом исследовании. В дополнительных аспектах изобретения, пациент, резистентный к плазмотерапии, который должен быть подвергнут лечению ингибитором MASP-2, предварительно подвергался плазмотерапии, по меньшей мере, один раз, и после такого лечения с помощью плазмотерапии, у него обнаруживали один или более клинических маркеров аHUS, которые адекватно не уменьшились или не были исключены в результате такой плазмотерапии.

Используемое в этом исследовании моноклональное антитело OMS646 является полностью человеческим IgG4 моноклональным антителом против человеческой MASP-2. Как показано в примере 40, OMS646 прочно связывается с рекомбинантной MASP-2 (с кажущейся равновесной константой диссоциации в диапазоне 100 пМ) и проявляет селективность более чем в 5000 раз выше по сравнению со связыванием с гомологичным белком C1s, C1r и MASP-1. В функциональных исследованиях, OMS646 ингибирует лектиновый путь у человека с активностью в наномолярном диапазоне концентраций (концентрация, приводящая к ингибированию 50% $[\text{IC}_{50}]$ приблизительно равна 3 нМ), но не оказывает существенного влияния на классический путь. Внутривенное или подкожное введение OMS646 мышам, приматам и людям приводило к высоким концентрациям в плазме, которые были связаны с подавлением активации лектинового пути при исследовании *ex vivo*. Как дополнительно описано в примере 42, введение OMS646 уменьшало осаждение C5b-9 и тромбообразование в экспериментальных моделях ТМА и тромбообразования *in vitro* на мышах, тем самым демонстрируя возможность терапевтического применения OMS646.

В этом исследовании, лекарственное средство OMS646 приготавливали с концентраций 100 мг/мл, которое затем разбавляли в случае внутривенного введения. Соответствующий рассчитанный объем раствора OMS646 100 мг/мл для инъекций отбирали из флакона шприцом для приготовления дозы. Мешок для инфузии применяли в течение 4 ч после приготовления.

На первой стадии исследования, OMS646 вводили в возрастающей дозе в группах, каждая из которых включала трех пациентов. Каждому субъекту на стадии 1 вводили дозу OMS646 один раз в неделю в течение четырех недель, как показано ниже в табл. 26.

Таблица 26
Схема дозирования на стадии 1

Стадия, группа	Число субъектов	Доза OMS646 (мг/кг)
1, группа 1	3	0,675, один раз в неделю x 4
1, группа 2	3	2,0, один раз в неделю x 4
1, группа 3	3	4,0, один раз в неделю x 4

Этап 1.



Разведенное исследуемое лекарственное средство вводили внутривенно в течение 30 мин.

Первичные конечные точки.

Сопутствующими первичными конечными точками были:

безопасность, которая оценивается по побочным эффектам (АЭ), основные показатели состояния организма, ЭКГ и клинические лабораторные испытания;

клиническая активность, определяемая по изменению количества тромбоцитов.

Вторичные конечные точки.

Вторичными конечными точками были:

клиническая активность ТМА;

LDH в сыворотке;

гаптоглобин в сыворотке;

гемоглобин;

креатинин в сыворотке;

симптомы, связанные с ТМА;

потребность в плазмотерапии (в замещении плазмы или в инфузии плазмы);

потребность в диализе.

Разрешенные сопутствующие терапии.

резистентный к плазмотерапии aHUS - плазмотерапия во время лечения с помощью OMS646 разрешалась, если исследователь считал, что она показана с медицинской точки зрения.

восприимчивый к продолжительной плазмотерапии aHUS исследователям было рекомендовано продолжить применение плазмотерапии до тех пор, пока не проявятся признаки улучшения ТМА, например, увеличение количества тромбоцитов, снижение LDH, увеличение гаптоглобина, увеличение гемоглобина, снижение креатинина, после чего исследователю было рекомендовано рассмотреть возможность отказа от плазмотерапии и проводить постоянный контроль параметров ТМА для оценки возможности отказа от применения плазмотерапии.

ТТР - применение плазмотерапии разрешали, если исследователь считал, что она показана с медицинской точки зрения.

Исследователям было рекомендовано, чтобы гемодиализ проводился в соответствии со стандартом лечения.

Экулизумаб не вводили во время исследования.

Результаты.

Первая группа субъектов состояла из трех пациентов aHUS, получавших самую низкую дозу OMS646. Наблюдались улучшения маркеров ТМА у всех пациентов в этой группе исследования. В качестве маркеров активности болезни определяли количество тромбоцитов, содержание лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке и содержание гаптоглобина в сыворотке. По сравнению с исходными уровнями, количество тромбоцитов улучшалось у всех пациентов. Уровни LDH в сыворотке оставались нормальными у одного пациента, существенно уменьшались до близкого к нормальному диапазону у другого пациента, и оставались повышенными в третьего пациента. Гаптоглобин улучшался в двух пациентов, нормализовался у одного пациента. У одного пациента с независимой функцией почек также улучшались уровни креатинина.

Согласно дизайну исследования, трех пациентов подвергали лечению с помощью средней дозы во второй группе этого клинического испытания. Два пациента с aHUS имеют резистентность к плазмотерапии, и один пациент страдает тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТР). Обоим пациентам с aHUS проводили гемодиализ до и во время исследования. Во второй группе или в группе со средней дозой, пациенты с aHUS с резистентностью к плазмотерапии характеризовались:

47% увеличением среднего количества тромбоцитов, что приводило к тому, что оба пациента имели количество тромбоцитов в диапазоне нормальных значений.

86% снижение среднего числа шизоцитов, при этом у одного пациента шизоциты исчезли.

71% увеличение среднего уровня гаптоглобина, при этом у двух пациентов он достигал диапазона нормальных значений во время лечения, у одного пациента он опускался чуть ниже нормы в течение

одной недели после последнего дозирования.

5% снижение средних уровней LDH, при этом уровни у двух пациентов оставались слегка повышенными относительно диапазона нормальных значений.

Пациенту с ТТР из группы со средней дозой требовалось повторение инфузии плазмы перед участием в исследовании. Лабораторные параметры не показали стойкого улучшения, но при лечении с помощью OMS646, а также на момент завершения лечения, пациенту не требовалась применение плазмотерапии.

Препарат хорошо переносился всеми пациентами на протяжении всего периода лечения. Основываясь на положительных результатах для второй группы или группы со средней дозой, были начаты исследования в третьей группе или группе с высокой дозой, а исследование пациента с aHUS уже были закончены. Данные, относящиеся ко всем пациентам, включают измерения в течение одной недели после введения последней дозы.

Было также завершено лечение с помощью OMS646 первого пациента в третьей группе (в группе с высокой дозой), пациента с aHUS, который был резистентен к плазмотерапии и имел дополнительные осложнения, включая гепатит С, криоглобулинемию и лимфому. До лечения с помощью OMS646, пациенту требовался повторный диализ. На протяжении лечения и после завершения курса с помощью OMS646 и до настоящего времени пациент не нуждался в диализе. Гематологические и почечные параметры показали:

- улучшение на 63% количества тромбоцитов, возвращение к нормальным уровням,
- снижение на 100% шистоцитов,
- гаптоглобин увеличился с неопределяемого уровня и нормализовался,
- снижение на 43% LDH, в результате чего установился уровень чуть выше нормы,
- снижение на 24% уровня креатинина.

Лекарственное средство хорошо переносилось как в первой группе, так и во второй группе.

Первичной конечной точкой в этом открытом клиническом исследовании фазы 2 является изменение количества тромбоцитов. Количество тромбоцитов у всех трех пациентов с aHUS в группах со средней и высокой дозой (два пациента в группе со средней дозой и один пациент в группе с высокой дозой) вернулось к норме, со статистически значимым средним увеличением от исходного уровня приблизительно 68000 тромбоцитов/мл ($p=0,0055$).

Таким образом, данные, полученные перед фазой 2 этого клинического исследования, демонстрируют эффективность воздействия OMS646 на пациентов с первичным aHUS, на пациентов с aHUS, резистентных к плазмотерапии, и на пациентов с ТТР.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от резистентный к плазмотерапии aHUS, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в стадию идентификации субъекта, страдающий от резистентный к плазмотерапии aHUS, перед введением субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело.

В соответствии с любым из раскрытых в изобретении вариантов осуществления, MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с K_D 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в CCP1 домена MASP-2, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в анализе *in vitro* в 1% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50} 30 нМ или менее, где антитело является фрагментом антитела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)2 и F(ab')2, где антитело является одноцепочечной молекулой, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь (то есть ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или нескольких клинических параметров, связанных с aHUS, таких как увеличение количества тромбоцитов, снижение LDH, увеличение гаптоглобина, увеличение гемоглобина и/или уменьшение креатинина.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту, страдающему от резистентного к плазмотерапии aHUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, в течение по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель), и затем введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в стадии длительного лечения, в течение по меньшей мере двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения плазмотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят с применением плазмотерапии.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела, субъекту, страдающему от резистентного к плазматерапии aHUS, либо внутривенно, внутримышечно, либо, предпочтительно, подкожно. Лечение может быть длительным и применяться от одного раза в день до одного раз в месяц, но, предпочтительно, один раз каждые две недели. MASP-2 ингибирующее антитело можно вводить отдельно или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от резистентного к плазматерапии aHUS, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70 или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67) и вариабельную область легкой цепи по меньшей мере, с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемого контрольным антителом OMS646, включающим вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как SEQ ID NO: 70.

Пример 45.

В этом примере описываются дополнительные результаты проводимого клинического испытания в фазе 2 с целью оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего антитела против MASP-2 у взрослых пациентов с тромботическими микроангиопатиями (ТМА), описанных в примере 44.

Уровень изученности проблемы. Как описано в примере 44, тромботические микроангиопатии (ТМА) представляют собой семейство редких, изнуряющих и опасных для жизни нарушений, характеризующихся образованием чрезмерного количества тромбов (сгустков) - агрегатов тромбоцитов - в капиллярном кровообращении органов тела, обычно в почках и головном мозге. Как описано в изобретении, ТМА на фоне трансплантации (ТА-ТМА) представляет собой очень опасный синдром, который может возникать у пациентов с трансплантацией, такой как трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

В этом примере описываются начальные результаты клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального MASP-2 ингибирующее антитело у пациента, страдающего от ТМА, связанной с трансплантацией стволовых клеток гематопозитических стволовых клеток.

Методы.

Как описано в примере 44, исследование ТМА в фазе 2 состоит из стадии трехуровневого дозирования, за которой следует стадия фиксированного дозирования MASP-2 ингибирующее антитело OMS646. Как дополнительно описано в примере 44, устойчивые и надежные положительные результаты были получены в случае пациентов с aHUS и одного пациента с ТТР. Так же, как и в случае группы с низкой дозой, OMS646 хорошо переносилось всеми пациентами в группах со средней и высокой дозами на протяжении всего периода лечения. Были завершены доклинические исследования токсичности, и они не выявили никаких проблем, связанных с безопасностью применения этого антитела, что позволяло проводить длительное дозирование при клинических испытаниях.

Как описано в примере 44, были получены данные клинического исследования фазы 2 OMS646 в случае ТМА для пациентов с aHUS и ТТР. Было закончено дозирование одного дополнительного пациента с ТММА, связанной с трансплантацией стволовых клеток, в группе с высокой дозой, используя ме-

тоды, описанные в примере 44. Этот пациент имел в анамнезе лимфому, в связи с которой он подвергался трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Течение его заболевания после трансплантации осложнялось рядом угрожающих жизни нарушений, в том числе и ТМА, требующей инфузии тромбоцитов. Несмотря на инфузию, у него сохранялась ТМА, связанная с трансплантацией стволовых клеток, и он принимал участие в исследовании в фазе 2 антитела OMS646.

Результаты.

После дозирования в течение четырех недель (группа с высокой дозой), как описано в примере 44, пациент с ТМА, связанной с трансплантацией стволовых клеток, характеризовался:

четырежды увеличением количества тромбоцитов, в результате чего количество тромбоцитов превысило 100000;

уровень гаптоглобина увеличился более чем в два раза и достиг нормы;

уровень лактатдегидрогеназы в плазме, показатель;

повреждения в кровеносных сосудах, уменьшился на 35%, но все еще был выше нормы;

обнаружилось присутствие единичных шистоцитов.

В течение всего времени дозирования OMS646 и после завершения лечения OMS646 пациент не требовал ни применения инфузии тромбоцитов, ни применения плазмафереза.

Таким образом, данные, полученные в фазе 2 этого клинического исследования (как описано в примере 44 и в этом примере), демонстрируют эффективность воздействия OMS646 на пациентов с первичным аHUS, на пациентов с аHUS, резистентных к плазматерапии, на пациентов с ТТР и на пациента с ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ лечения человека, страдающего от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, которая резистентна к лечению путем инфузии тромбоцитов и/или плазмафереза. В одном варианте осуществления способ включает идентификацию человека, страдающего от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, которая резистентна к лечению путем инфузии тромбоцитов и/или плазмафереза, до стадии введения субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимая активация комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в изобретении вариантов осуществления, MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с K_D 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в ССР1 домена MASP-2, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в анализе *in vitro* в 1% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 30 нМ или менее, где антитело является фрагментом антитела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)2 и F(ab')2, где антитело является одноцепочечной молекулой, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь (то есть ингибирует лектиновый путь, оставляя незатронутым классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или нескольких клинических параметров, относящихся к ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, таких как увеличение количества тромбоцитов (например, по крайней мере, в два раза, по меньшей мере, в три раза, по меньшей мере, в четыре раза, по сравнению с числом тромбоцитов до лечения), увеличение гаптоглобина и/или снижение лактатдегидрогеназы.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере, в течение от одного дня до недели или двух недель) с последующим введением MASP-2 ингибирующего антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в течение длительного времени, по меньшей мере, в течение двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения плазматерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят при применении плазматерапии.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, либо внутривенно, внутримышечно, либо, предпочтительно, подкожно. Лечение может быть длительным и проводиться от одного раза в день до одного раза в месяц, но, предпочтительно, один раз каждые две

недели. MASP-2 ингибирующее антитело можно вводить отдельно или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот от 95-102 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70 или (II) его вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере с 90% тождественностью с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 67) и вариабельную область легкой цепи по меньшей мере, с 90% тождественностью (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, включающую в себя аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельная область легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемого контрольным антителом OMS646, включающим вариабельную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

Пример 46.

В этом примере описываются дополнительные результаты, полученные в проводимом клиническом исследовании фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального MASP-2 ингибирующего антитела у взрослых пациентов с тромботическими микроангиопатиями (ТМА), описанных в примерах 44 и 45.

Уровень изученности проблемы.

Как описано в примере 45, ТМА (ТА-ТМА), связанная с трансплантацией, является очень опасным синдромом, который может возникать у пациентов, перенесших трансплантацию, таких как реципиенты трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). ТМА, связанные с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-ТМА), представляют собой опасное для жизни осложнение, вызванное повреждением эндотелия. Наиболее часто поражаемым органом являются почки, хотя HSCT-ТМА может представлять собой и системное заболевание, при котором также поражаются легкое, кишечник, сердце и мозг. Возникновение даже легкой ТМА связано с длительной почечной недостаточностью. Развитие посталлогенной HSCT-связанной ТМА отличается по частоте возникновения, в зависимости от различных диагностических критериев и схем предотвращения отторжения трансплантата в организме-хозяина, при этом ингибиторы кальциневрина наиболее часто вызывают возникновение HSCT-связанной ТМА (Ho VT et al., Biol Blood Marrow Transplant, 11(8):571-5, 2005). Модификация режима дозирования иммуносупрессивного ингибитора кальциневрина может приводить к улучшению ТМА у некоторых пациентов в течение нескольких недель после отмены или прекращения введения ингибитора кальциневрина.

ТМА является потенциально опасным для жизни осложнением при HSCT, и в настоящее время тактика лечения основана, в значительной степени, на уменьшении воздействия провоцирующих факторов, включая исключение применения иммунодепрессантов (например, ингибиторов кальциневрина) и лечение текущих инфекций, а также на поддерживающих терапиях, таких как гемодиализ. Несмотря на то что многие пациенты HSCT-ТМА хорошо реагируют на снижение или прерывание приема иммунодепрессантов, тем не менее, существует подгруппа пациентов, у которых наблюдается устойчивая HSCT-ТМА, несмотря на консервативные способы лечения (то есть ТМА не реагирует на уменьшение дозы иммунодепрессантов или на прерывание их приема). Пациенты, которые не реагируют на эти консервативные методы лечения, имеют плохой прогноз. Замещение плазмы было неэффективным, и никакой другой терапии одобрено не было.

В примере 45 описаны начальные положительные результаты клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального MASP-2 ингибирующего антитела (OMS646) у пациента, страдающего от постоянной ТГМ, связанной с трансплантацией гематopoэтических стволовых клеток (HSCT-ТМА). В этом примере описываются дополнительные результаты текущего клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности OMS646 у трех дополнительных субъектов, страдающих постоянной HSCT-ТМА, резистентной к консервативным способам лечения.

Методы.

Как описано в примере 44, исследование ТМА в фазе 2 состоит из стадии трехуровневого дозирования, за которой следует введение фиксированной дозы MASP-2 ингибирующего антитела OMS646. OMS646 хорошо переносился всеми пациентами в группах с низкой, средней и высокой дозами на протяжении всего периода лечения. Были завершены доклинические исследования токсичности, и они не выявили никаких проблем, связанных с безопасностью применения этого антитела, что позволяло проводить длительное дозирование при клинических испытаниях.

В исследовании ТМА в фазе 2 участвовали субъекты, страдающие постоянной ТМА, связанной с HSCT, резистентной к консервативным способам лечения, которую определяли для целей настоящего исследования, как характеризующуюся всеми приведенными ниже показателями, по меньшей мере, через две недели после отмены или прекращения приема иммуносупрессивного средства (например, ингибитора кальциневрина) или, по меньшей мере, через 30 дней после трансплантации:

тромбоцитопения (количество тромбоцитов $< 150000/\text{мкл}$) и доказательства микроангиопатической гемолитической анемии (наличие шистоцитов, лактатдегидрогеназа (LDH) в сыворотке $>$ верхнего предела нормы (ULN) или гаптоглобин $<$ нижнего предела нормы (LLN)).

Разрешенная сопутствующая терапия для HSCT-связанной ТМА.

Применение плазмотерапии во время лечения с помощью OMS646 разрешали, если исследователь считал, что он показан с медицинской точки зрения. Пациентам, в отношении которых применяли плазмотерапию, могли вводить дополнительные половинные дозы OMS646.

Исследователям было рекомендовано, чтобы гемодиализ проводился в соответствии со стандартом лечения.

Экулизумаб не вводили во время исследования.

В это исследование ТМА включены субъекты, страдающие постоянной HSCT-ТМА, которая резистентна к стандартным способам лечения (то есть постоянная ТМА, по меньшей мере, через две недели после отмены или прерывания лечения ингибитором кальциневрина).

Как описано в примере 45, было завершено дозирование пациента, страдающего постоянной HSCT-ТМА (пациент # 1), в группе с высокой дозой (4 мг/кг OMS646, вводимой внутривенно один раз в неделю в течение четырех недель) с использованием методов, описанных в примере 44.

Было завершено дозирование дополнительных 4 пациентов, страдающих постоянной HSCT-ТМА, как описано ниже.

Пациенту # 1 (описанному в примере 44) вводили OMS646 в течение четырех недель (4 мг/кг внутривенно один раз в неделю).

Пациентам # 2 и # 3 вводили OMS646 в течение восьми недель (4 мг/кг внутривенно один раз в неделю).

Пациентам # 4 и # 5 вводили OMS646 (4 мг/кг внутривенно один раз в неделю) в течение двух и трех недель соответственно. Пациенты # 4 и # 5, выведенные из исследования после двух и трех недель, соответственно, не отреагировали на лечение и их состояние ухудшилось. Следует отметить, что у одного из этих пациентов был обнаружен повышенный креатинин во время начала исследования.

Результаты.

В этом исследовании участвовали пять пациентов с постоянной HSCT-ТМА. Все пациенты были взрослыми людьми, и им проводили трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) в связи с наличием у них гематологических злокачественных опухолей. На фигурах 58, 59 и 60 приведены изменения относительно базовой линии переменных для ТМА после лечения MASP-2 ингибирующим антителом OMS646. На этих фигурах приведены данные по всем пяти пациентам, в случае двух из которых исследование было прекращено через 2-3 недели, после чего у одного пациента произошел рецидив, а другому оказывали паллиативную помощь. Как отмечено на фиг. 58, 59 и 60, последнее введение антитела могло быть проведено на 7 неделе.

На фиг. 58 графически представлено среднее изменение количества тромбоцитов от исходного уровня в течение времени (недели) у субъектов, страдающих от персистирующей тромбоцитарной микроангиопатии, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-ТМА), после введения MASP-2 ингибирующего антитела (OMS646).

На фиг. 59 графически представлено среднее изменение LDH от исходного уровня в течение времени (недели) у субъектов, страдающих персистирующей (HSCT-ТМА) после введения MASP-2 ингибирующего антитела (OMS646).

На фиг. 60 графически представлено среднее изменение гаптоглобина от исходного уровня в течение времени (недели) у субъектов, страдающих персистирующей (HSCT-TMA) после введения MASP-2 ингибирующего антитела (OMS646).

Как показано на фиг. 59 и 60, во время лечения наблюдалось статистически значимое улучшение показателей LDH и гаптоглобина. Как показано на фиг. 58, показатель количества тромбоцитов улучшался, но не был статистически значим в силу небольшого количества пациентов. Из трех пациентов, для которых лечение было закончено, у одного пациента не улучшился показатель креатинина, но он получал сопутствующие нефротоксические терапевтические средства. Показатель креатинина улучшался или оставался нормальным у двух других пациентов. При длительном последующем наблюдении, у одного пациента трансплантация оказалось неудачной, и он ожидал второй трансплантации. Состояния остальных двух пациентов оставались стабильными.

Несмотря на вероятность наложения друг на друга действия лекарственных препаратов, связанные с подавлением костного мозга и нефротоксичностью у двух субъектов, наблюдались положительные эффекты лечения с помощью OMS646 у трех субъектов, страдающих от персистирующей HSCT-TMA (один из которых описан в примере 45), и которые дополнительно описаны ниже. Примечательно, что первые положительные результаты лечения у каждого из трех пациентов наблюдались после приблизительно трех недель лечения с помощью OMS646.

Пациент # 1 (лечение в течение 4 недель, как описано в примере 45). Подводя вкратце итоги, количество тромбоцитов увеличилось в четыре раза, в результате чего количество тромбоцитов превысило 100000/мкл, уровень гаптоглобина увеличился более чем в два раза и был нормальным, уровень лактатдегидрогеназы в плазме снизился на 35%, но все еще был выше нормы, и обнаруживался только один шистосит.

Пациент # 2 (лечение в течение 8 недель). Лечение не оказывало влияние на количество тромбоцитов, хотя пациент также страдал от подавления костного мозга на фоне одновременного лечения с помощью валганцикловира и позже у него произошло отторжение трансплантата, уровень лактатдегидрогеназы в плазме снизился с 712 Ед/л до 256 Ед/л, уровень гаптоглобина увеличился от неопределяемых уровней до 250 мг/дл.

Пациент # 3 (лечение в течение 8 недель). Количество тромбоцитов увеличилось с 1350 0/мкл до 133000/мкл; уровень лактатдегидрогеназы в плазме снизился с 537 до 225 Ед/л, уровень гаптоглобина увеличился от неопределяемых уровней до 181 мг/дл.

Краткое изложение результатов.

В случае трех пациентов, страдающих персистирующей HSCT-связанной TMA, для которых было завершено дозирование OMS646, данные демонстрируют сильный и устойчивый эффект. Во время лечения наблюдались статистически значимые улучшения показателя LDH и гаптоглобина. Улучшался показатель количества тромбоцитов, но он не был статистически значимым при этом небольшом числе пациентов. Из трех пациентов, которые завершили лечение, у одного пациента не было улучшения показателя креатинина, но он получал параллельно нефротоксические средства. Показатель креатинина улучшался или оставался в норме у двух других пациентов.

Выводы.

Антитело OMS646 улучшало показатели маркеров TMA у пациентов, страдающих персистирующей HSCT-TMA, которые не реагировали на консервативные способы лечения. Пациенты HSCT-TMA, которых подвергали лечению с помощью OMS646, являются одними из самых сложных для лечения пациентами, и при этом антитело OMS646 продемонстрировало положительные терапевтические эффекты в отношении пациентов с высоким риском персистирующей HSCT-TMA, несмотря на консервативные способы лечения.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ лечения человека, страдающего от TMA, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от персистирующей TMA, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к консервативным способам лечения. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию человека, страдающего персистирующей TMA, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к консервативным способам лечения, до стадии введения субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2 зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в изобретении вариантов осуществления, MASP-2 ингибирующее антитело проявляет по меньшей мере одной или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческую MASP-2 с K_D 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в CCP1 домена MASP-2, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в анализе *in vitro* в 1% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует осаждение C3b в 90% человеческой сыворотке при величине IC_{50} 30 нМ или менее, где антитело является фрагментом ан-

титела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)2 и F(ab')2, где антитело является одноцепочечной молекулой, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и практически не ингибирует классический путь (то есть ингибирует лектиновый путь, оставляя незатронутым классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2 ингибирующее антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или нескольких клинических параметров, относящихся к ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, таких как увеличение количества тромбоцитов (например, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза больше, чем количество тромбоцитов до лечения), увеличение гаптоглобина и/или снижение лактатдегидрогеназы.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере, в течение от одного дня до недели или двух недель, или трех недель или четырех недель или более), с последующим введением MASP-2 ингибирующего антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, в течение длительного времени, по меньшей мере, в течение двух недель или более). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят без применения плазмотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени проводят с применением плазмотерапии.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2 ингибирующего антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, либо внутривенно, внутримышечно, либо подкожно. Лечение может быть длительным и применяться от одного раза в день до одного раза в месяц, но, предпочтительно, по меньшей мере один раз каждые две недели, или, по меньшей мере, раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю. MASP-2 ингибирующее антитело можно вводить отдельно или в комбинации с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от персистирующей ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие варируемую область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, обозначаемой как последовательность SEQ ID NO: 67, и варируемую область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, обозначаемой как последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления композиция включает ингибирующее антитело MASP-2, содержащее (a) варируемую область тяжелой цепи, включающую: i) тяжелую цепь CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот от 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и ii) тяжелую цепь CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот от 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и iii) тяжелую цепь CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот от 95-107 последовательности SEQ ID NO: 67 и b) варируемую область легкой цепи, включающую: i) легкую цепь CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот от 24-34 последовательности SEQ ID NO: 70; и ii) легкую цепь CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот от 50-56 последовательности SEQ ID NO: 70; и iii) легкую цепь CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот от 89-97 последовательности SEQ ID NO: 70 или (II), вариант, который включает варируемую область тяжелой цепи, по меньшей мере, с тождественностью 90% с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 100% тождественностью с SEQ ID NO: 67), и варируемую область легкой цепи, по меньшей мере, с тождественностью 90% (например, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98%, по меньшей мере с 99% тождественностью с SEQ ID NO: 70).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2 ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие варируемую область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и варируемую область легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на человеческой MASP-2, распознаваемую контрольным антителом OMS646, включающим варируемую область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и варируемую область легкой цепи, обозначаемую как последовательность

SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от ТМА, связанной с HSCT, или подверженному риску развития ТМА, связанной с HSCT, включая субъекта, страдающего от персистирующей ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, которая резистентна к консервативным способам лечения, композиции, включающей MASP-2 ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область, включающую аминокислотную последовательность, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе от 1 до 10 мг/кг (то есть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг), по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере, два раза в неделю или, по меньшей мере, три раза в неделю) в течение по меньшей мере 3 недель, или в течение по меньшей мере 4 недель, или в течение по меньшей мере 5 недель, или в течение по меньшей мере 6 недель, или в течение по меньшей мере 7 недель, или в течение по меньшей мере 8 недель.

Несмотря на то что в изобретении были описаны и проиллюстрированы не являющиеся ограничениями варианты осуществления, тем не менее, очевидно, что в изобретение могут быть внесены различные изменения без отклонения от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения человека, страдающего от персистирующей тромботической микроангиопатии (ТМА), связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-ТМА), включающий введение субъекту композиции, содержащей MASP-2 ингибирующее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие переменную область тяжелой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, обозначаемую как последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе по меньшей мере 4 мг/кг, при по меньшей мере еженедельном введении в период, составляющий по меньшей мере три недели, где у указанного субъекта имеется ТМА, которая персистирует, несмотря на уменьшение или прекращение приема иммуносупрессивного средства, или где у указанного субъекта имеется ТМА, которая персистирует по меньшей мере через 30 дней после трансплантации, где указанное введение улучшает по меньшей мере один или более из следующих клинических параметров, обусловленных персистирующей ТМА, связанной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток: (i) увеличение количества тромбоцитов; (ii) увеличение гаптоглобина; (iii) снижение лактатдегидрогеназы (LDH); и/или (iv) снижение креатинина.

2. Способ по п.1, где антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего пониженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

3. Способ по п.1, где MASP-2 ингибирующее антитело не ингибирует классический путь.

4. Способ по п.1, где MASP-2 ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% сыворотке человека с величиной IC_{50} 30 нМ или менее.

5. Способ по п.1, где MASP-2 ингибирующее антитело вводят субъекту системно.

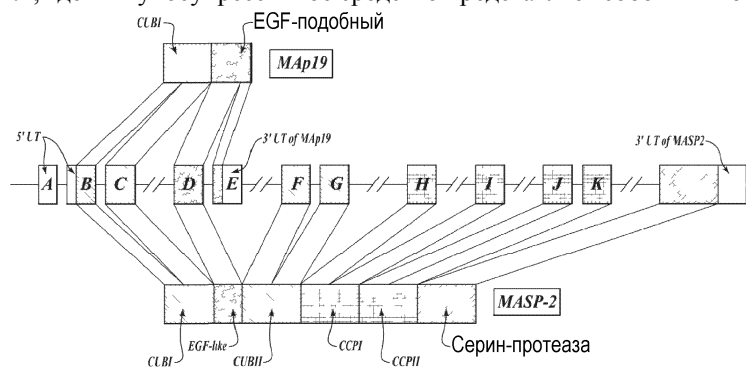
6. Способ по п.1, где субъекта подвергали ранее или подвергают в данный момент лечению гуманизированным антителом против C5 или его антигенсвязывающим фрагментом.

7. Способ по п.1, где количество тромбоцитов увеличивается по меньшей мере в два раза по сравнению с количеством тромбоцитов до указанного введения.

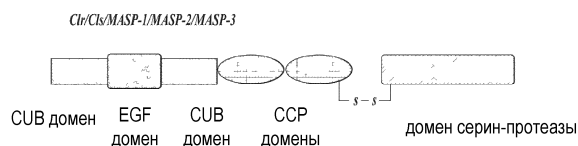
8. Способ по п.1, где у субъекта имеется ТМА, которая персистирует в течение по меньшей мере двух недель после уменьшения или прекращения приема иммуносупрессивного средства.

9. Способ по п.1, где у указанного субъекта имеется ТМА, которая персистирует по меньшей мере через 30 дней после трансплантации.

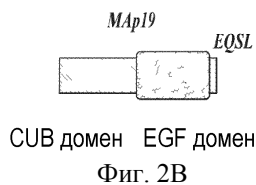
10. Способ по п.1, где иммуносупрессивное средство представляет собой ингибитор кальциневрина.



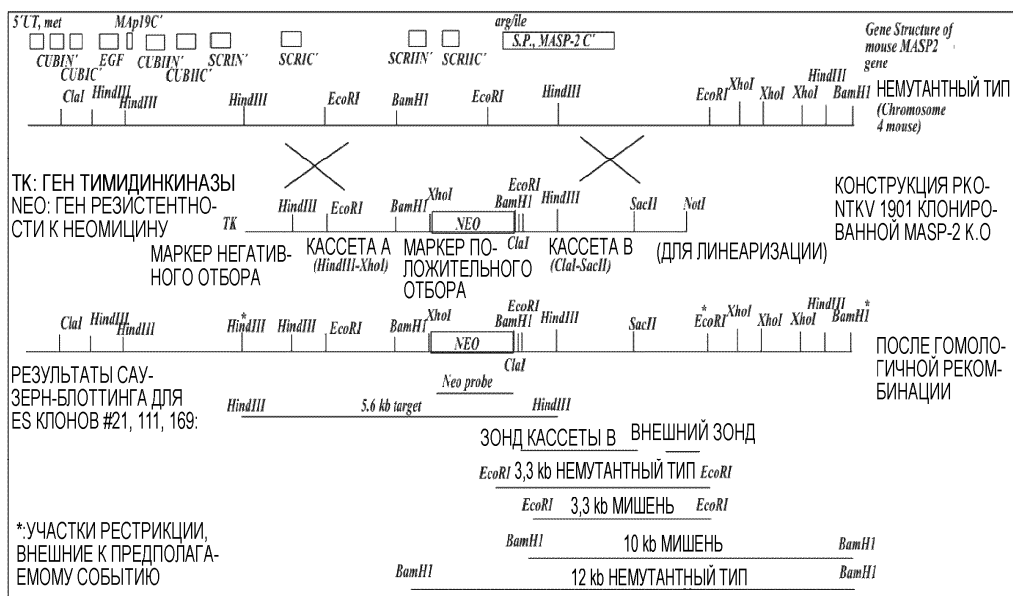
Фиг. 1



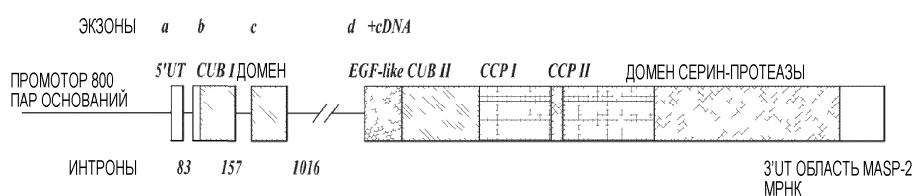
Фиг. 2А



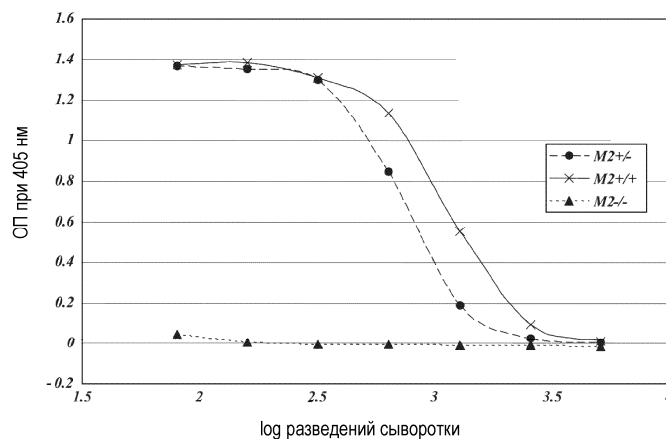
Фиг. 2В



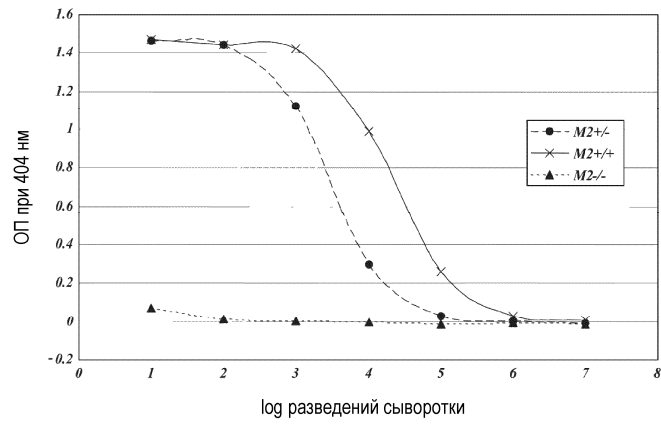
Фиг. 3



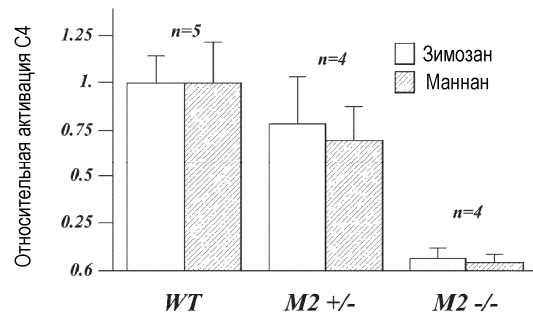
Фиг. 4



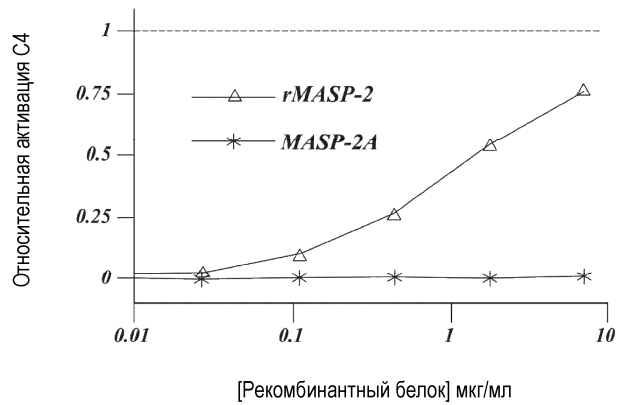
Фиг. 5А



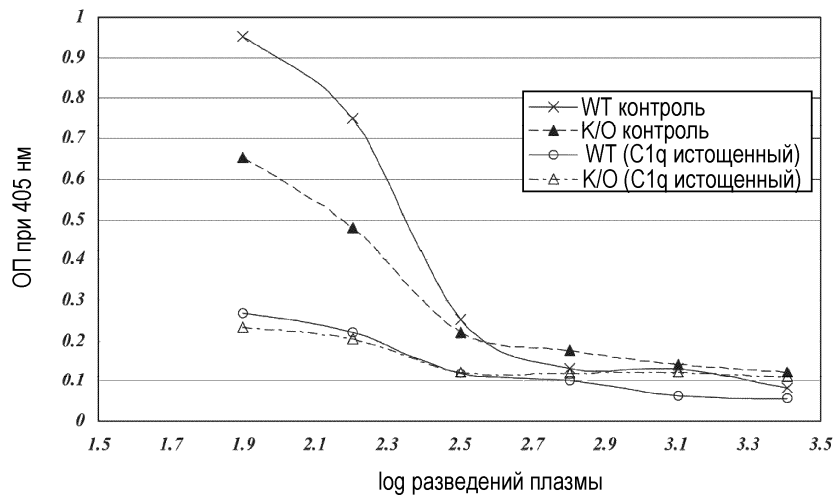
Фиг. 5B



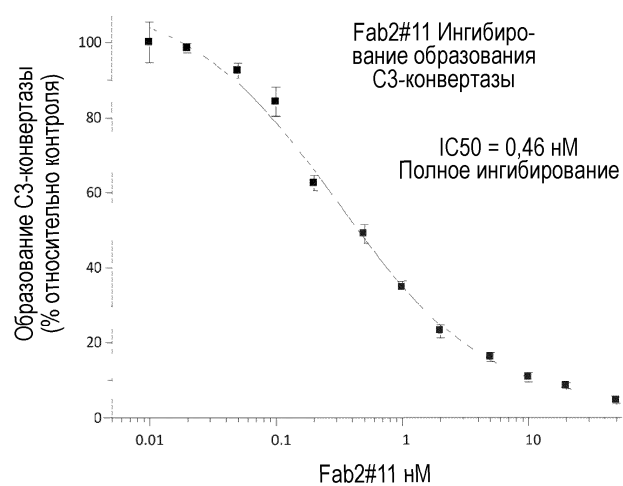
Фиг. 5C



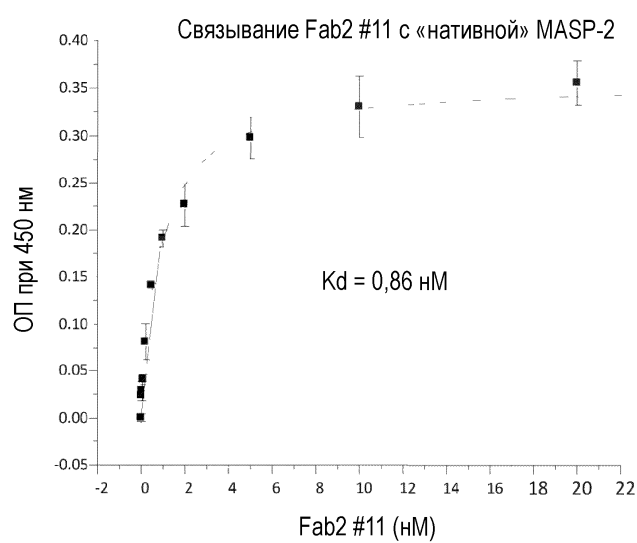
Фиг. 6



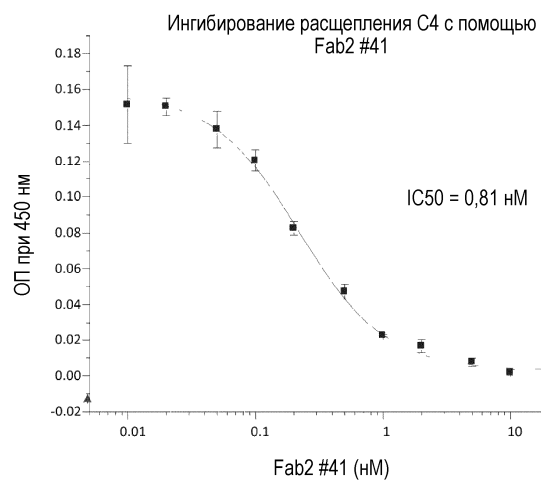
Фиг. 7



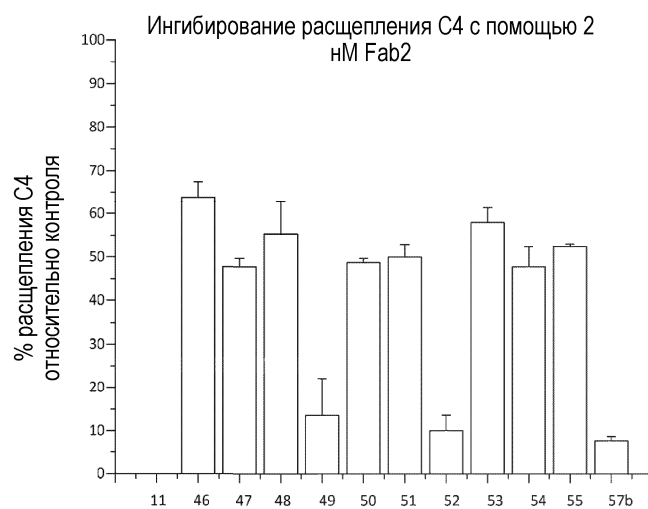
Фиг. 8А



Фиг. 8В

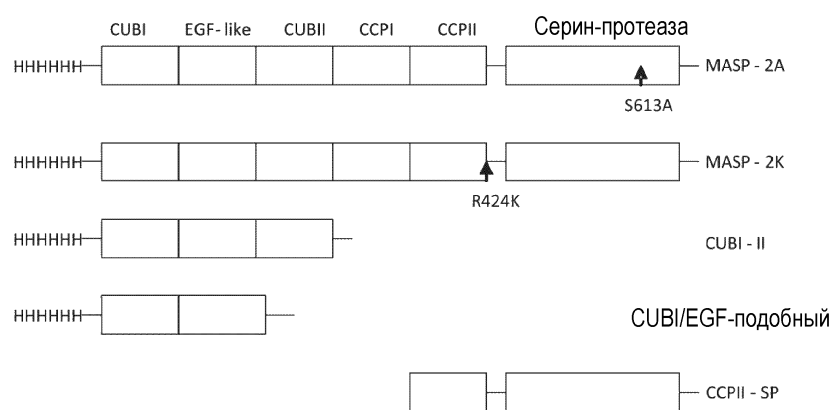


Фиг. 8С



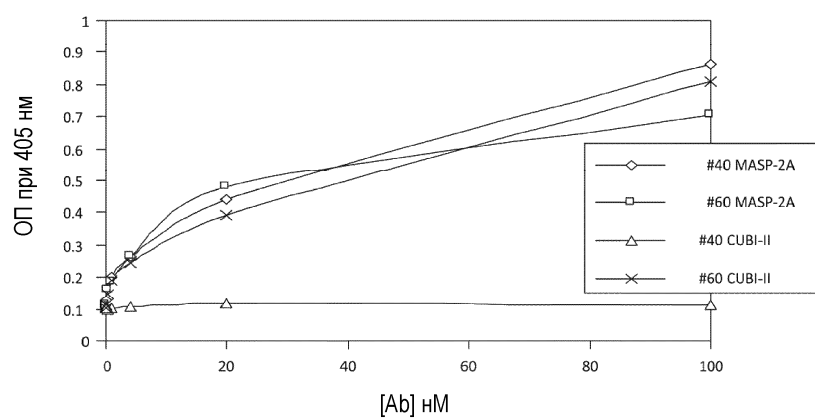
Fab2s против MASP2

Фиг. 9

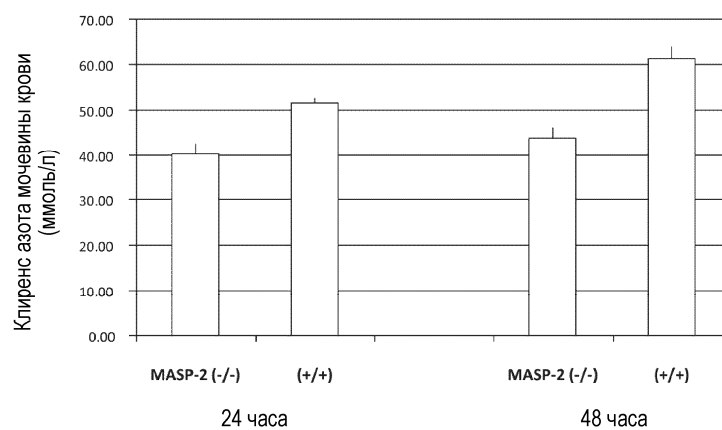


Фиг. 10

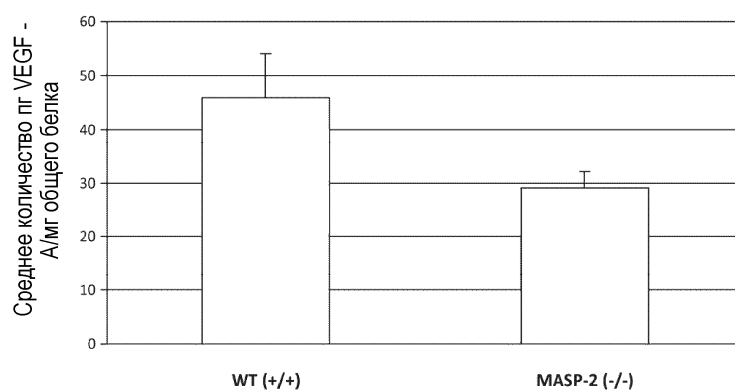
Связывание AbD Ab #40 и #60 с полипептидами крысиной MASP2



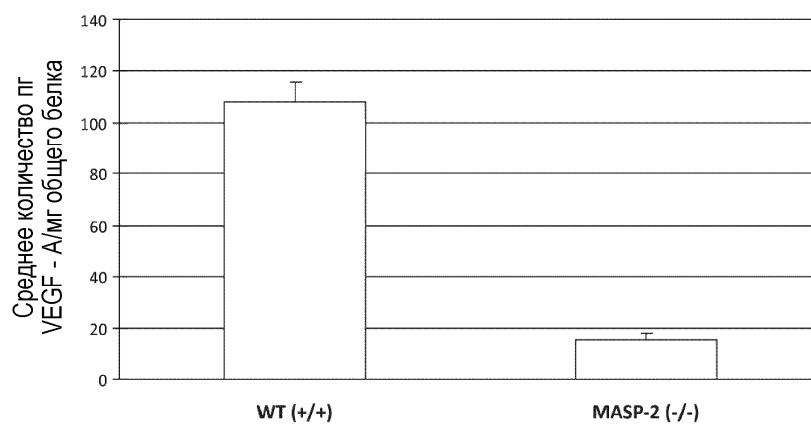
Фиг. 11



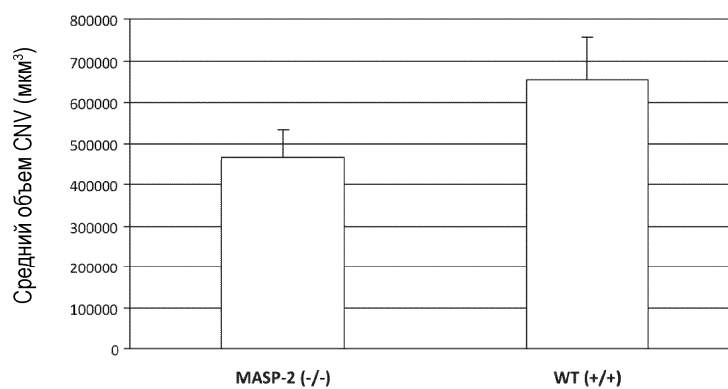
Фиг. 12



Фиг. 13А

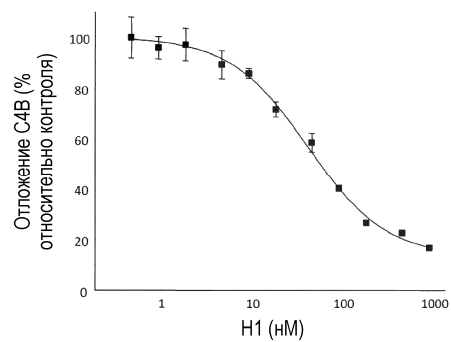


Фиг. 13В

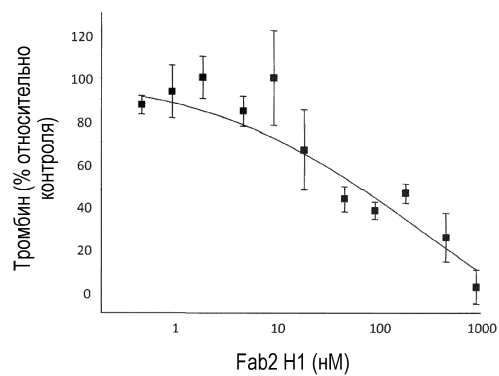


Фиг. 14

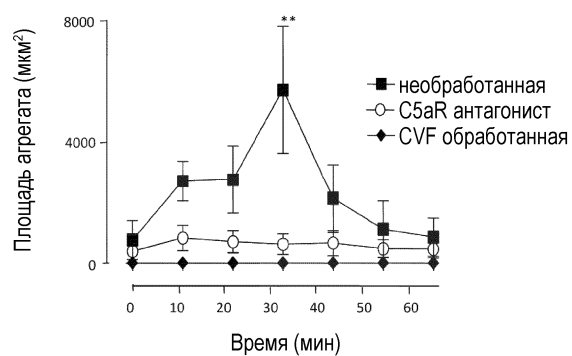
042534



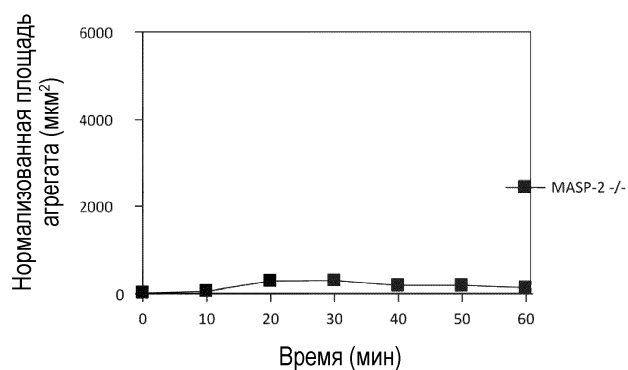
Фиг. 15А



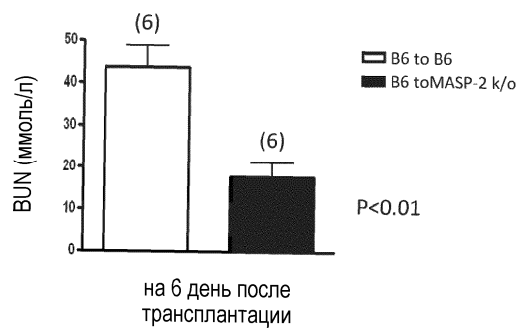
Фиг. 15В



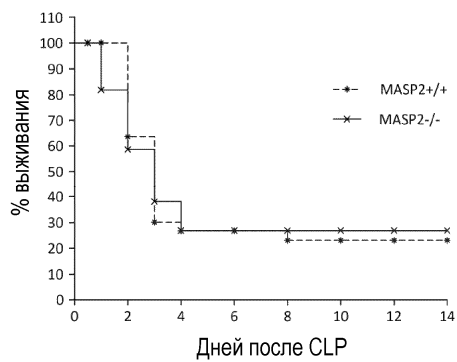
Фиг. 16А



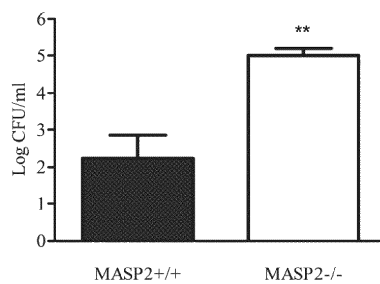
Фиг. 16В



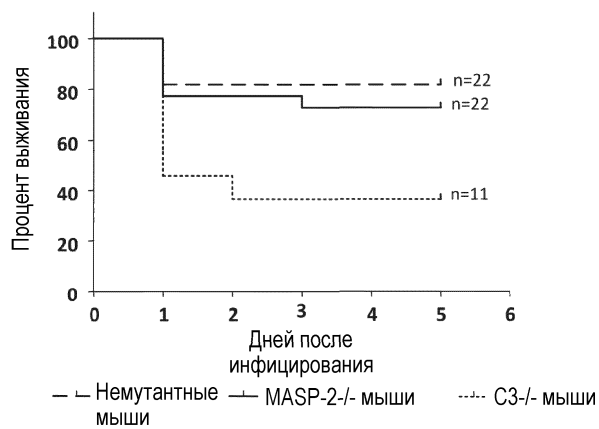
Фиг. 17



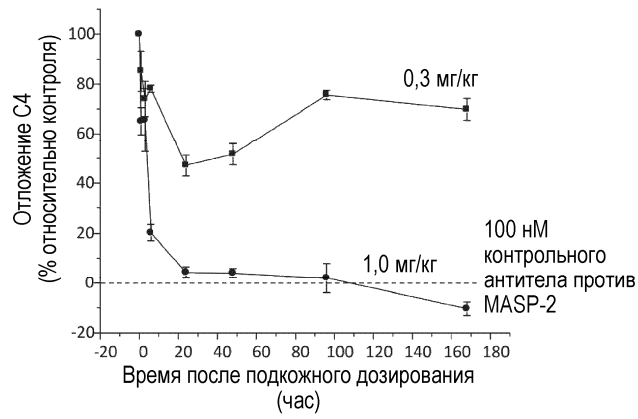
Фиг. 18



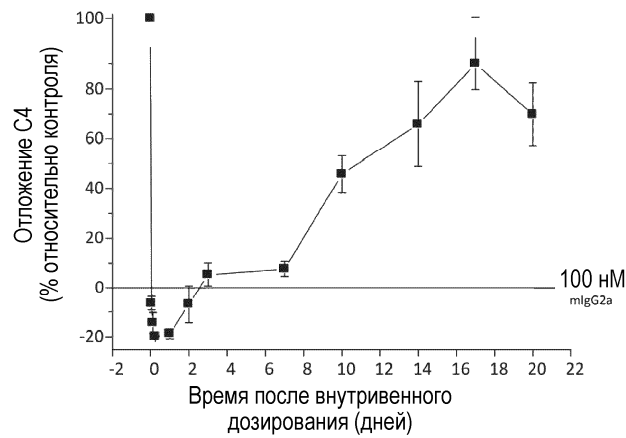
Фиг. 19



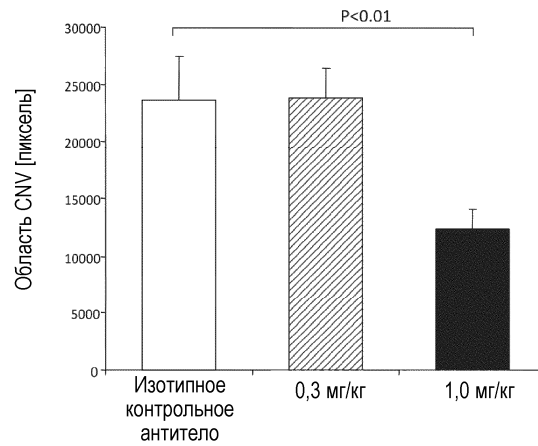
Фиг. 20



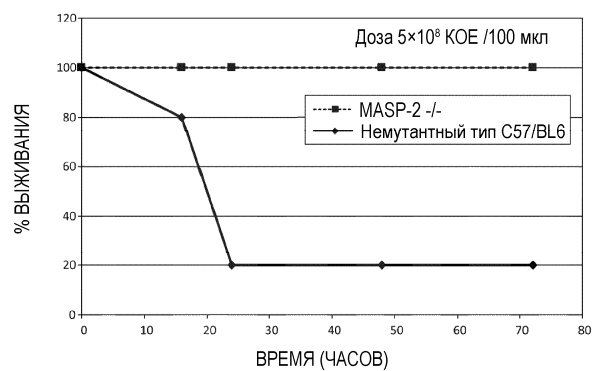
Фиг. 21



Фиг. 22

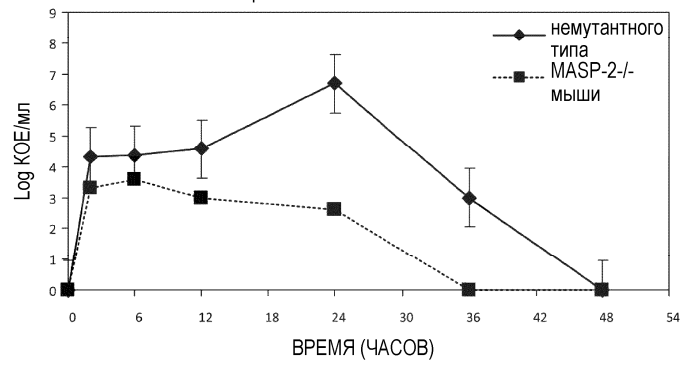


Фиг. 23

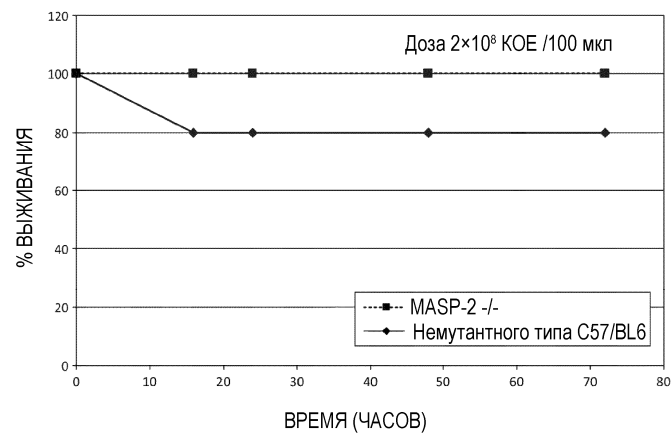


Фиг. 24А

КОЕ менингококка, определенные в различные моменты времени в крови немутантных мышей и MASP-2^{-/-} мышей после инфицирования с помощью 5×10^8 КОЕ менингококка /100 мкл

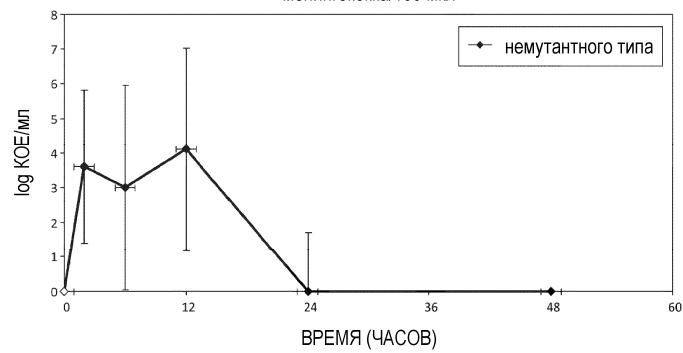


Фиг. 24В



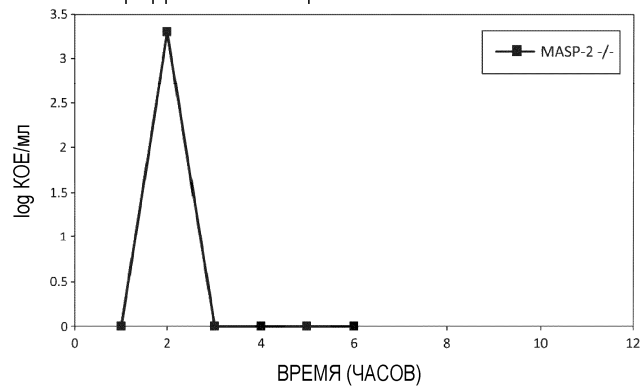
Фиг. 25А

КОЕ менингококка, определенные в различные моменты времени в крови немутантных C57/BL6 мышей после инфицирования с помощью 2×10^8 КОЕ менингококка/100 мкл

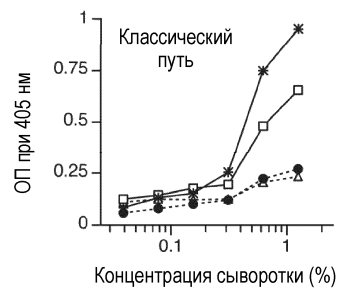


Фиг. 25В

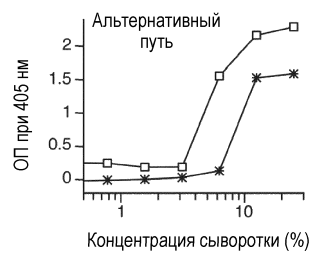
КОЕ менингококка, определенные в различные моменты времени в крови MASP-2 нокаутных мышей после инфицирования с помощью 2×10^8 КОЕ менингококка/100 мкл



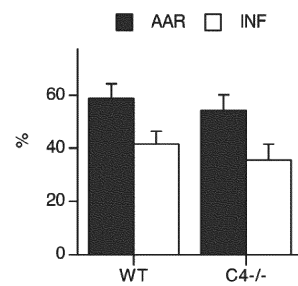
Фиг. 25С



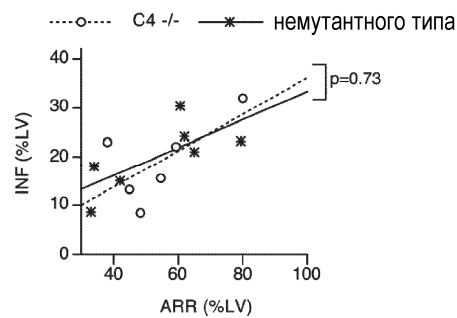
Фиг. 26А



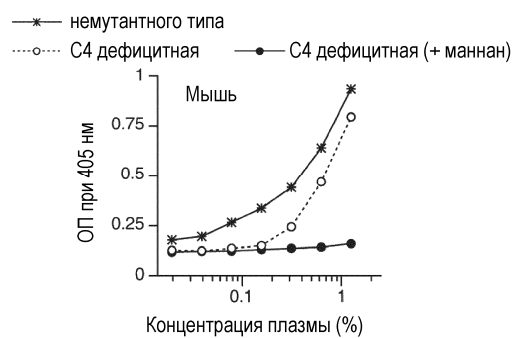
Фиг. 26В



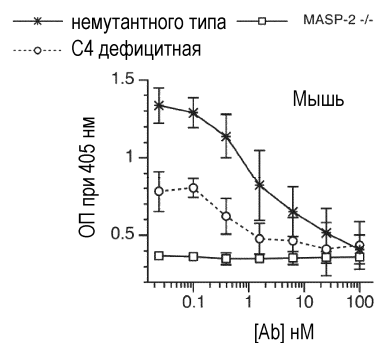
Фиг. 27А



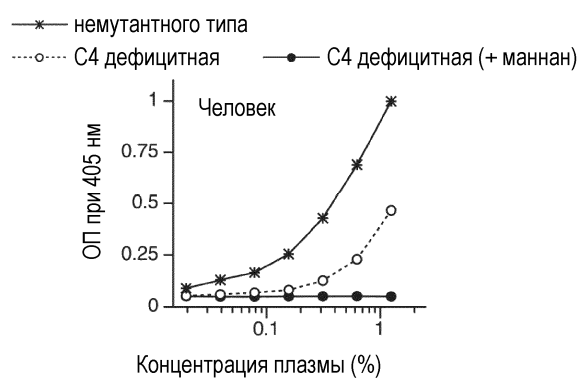
Фиг. 27В



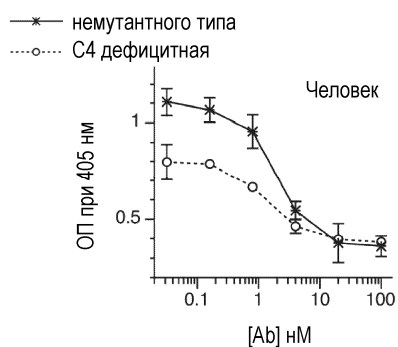
Фиг. 28А



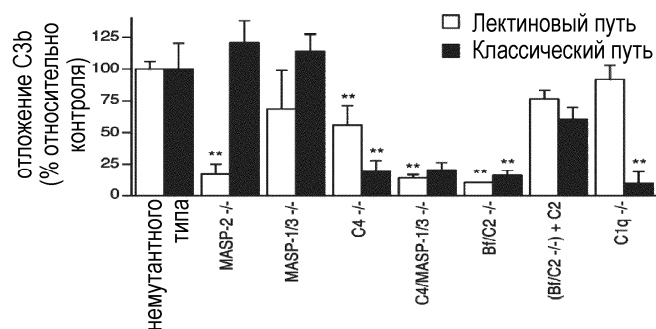
Фиг. 28В



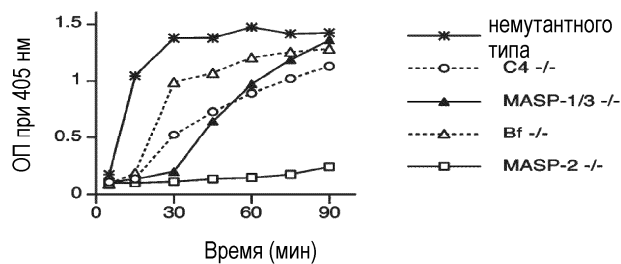
Фиг. 28С



Фиг. 28D

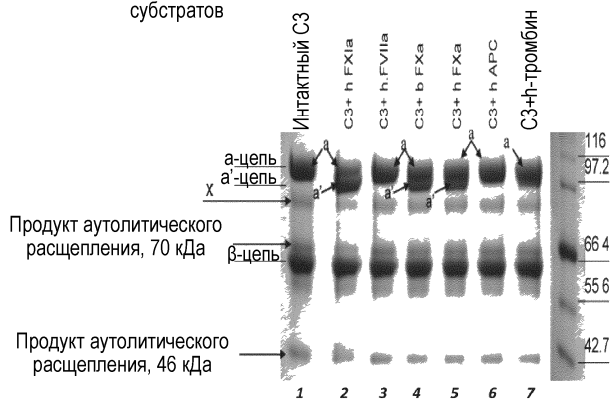


Фиг. 29А

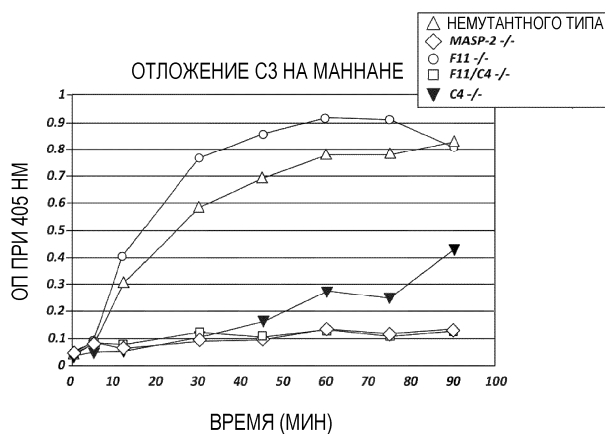


Фиг. 29В

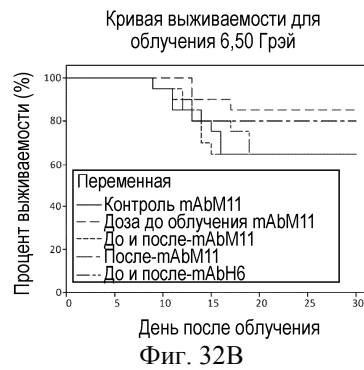
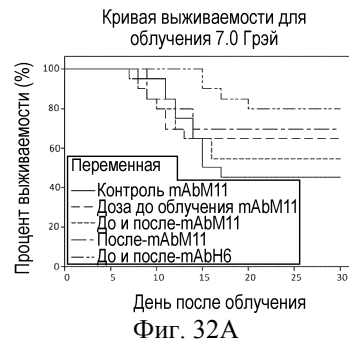
Активация С3 с помощью тромбиновых субстратов



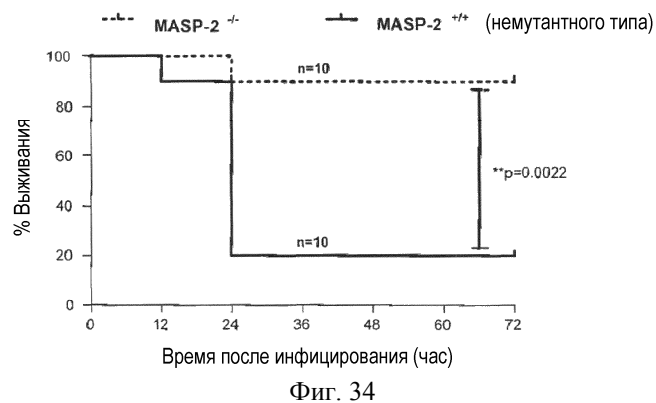
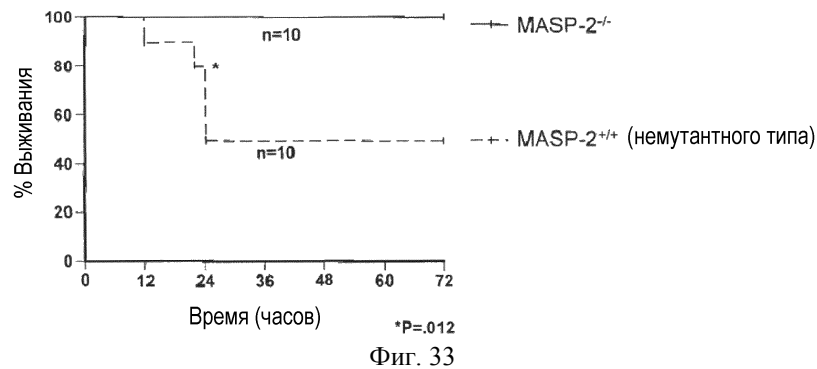
Фиг. 30

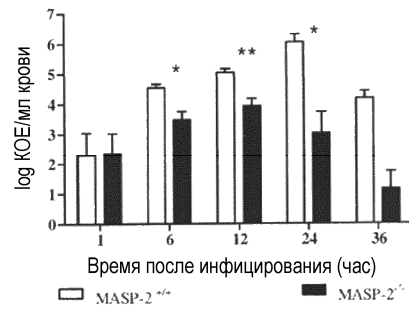


Фиг. 31

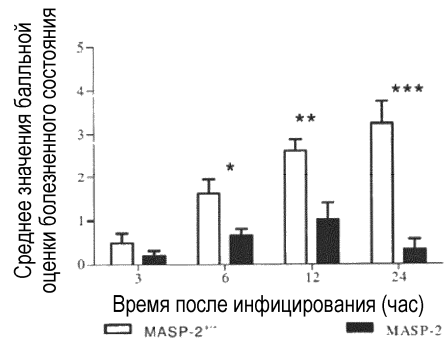


Выживание после инфицирования менингококком серологической группы A Z2491

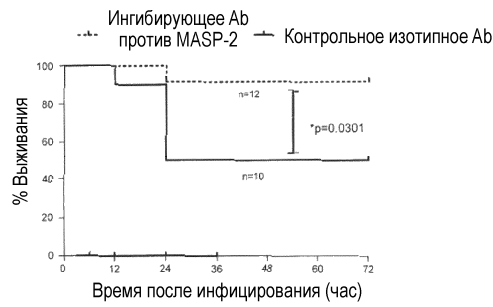




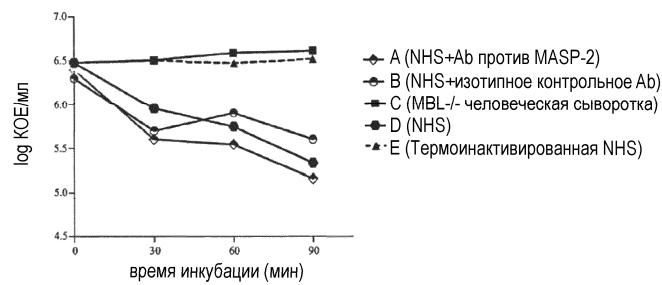
Фиг. 35



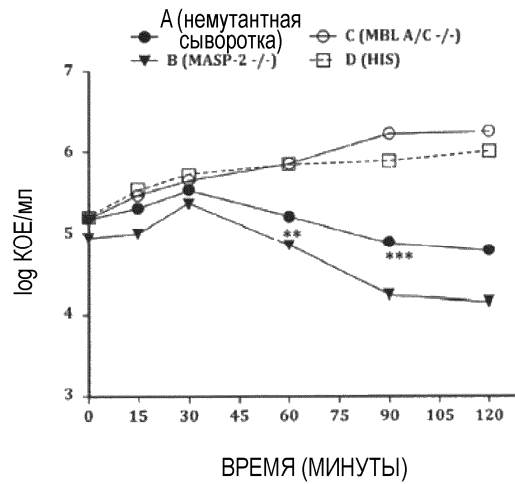
Фиг. 36



Фиг. 37

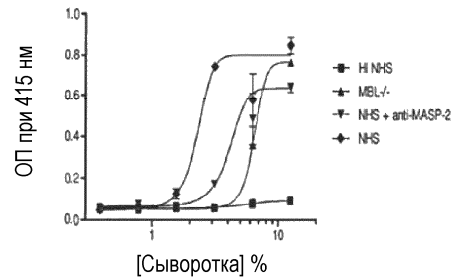


Фиг. 38



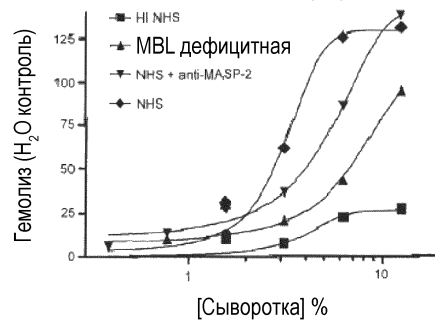
Фиг. 39

Гемолиз покрытых маннаном мышинных эритроцитов при воздействии сыворотки человека



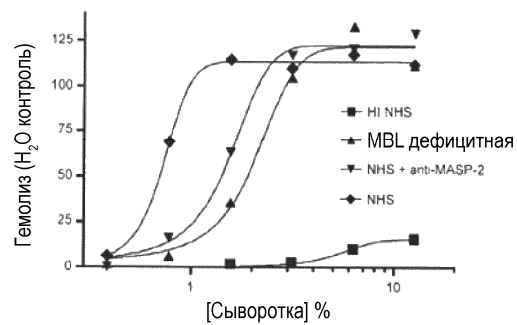
Фиг. 40

Гемолиз эритроцитов нормальных мышей при воздействии сыворотки человека
MBL deficient - MBL дефицитная

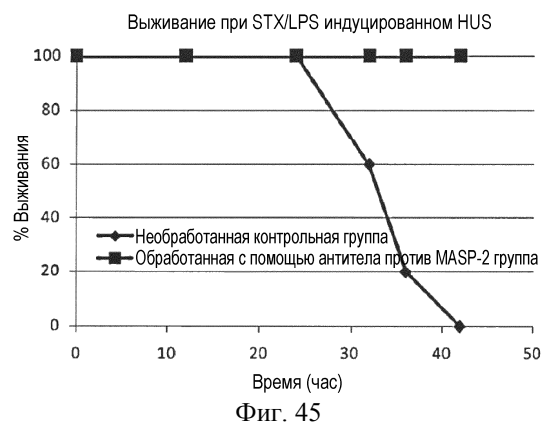
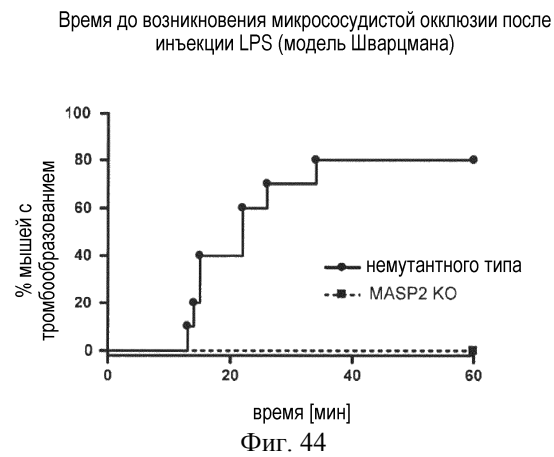
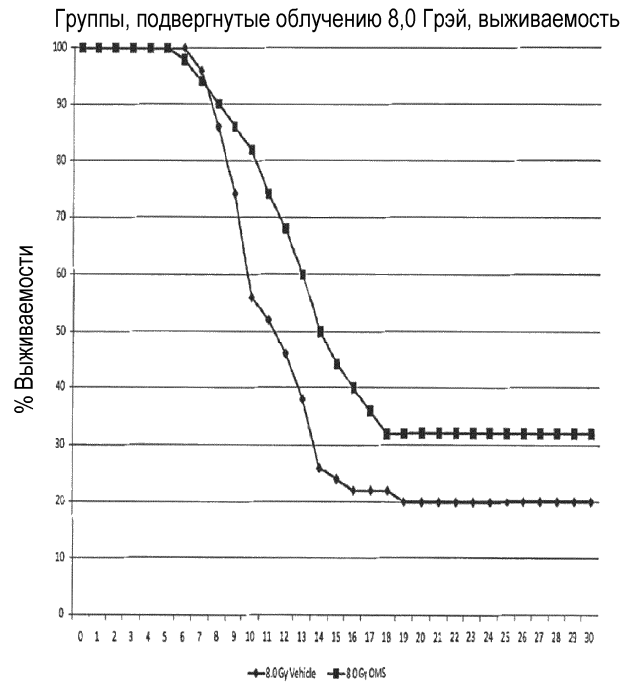


Фиг. 41

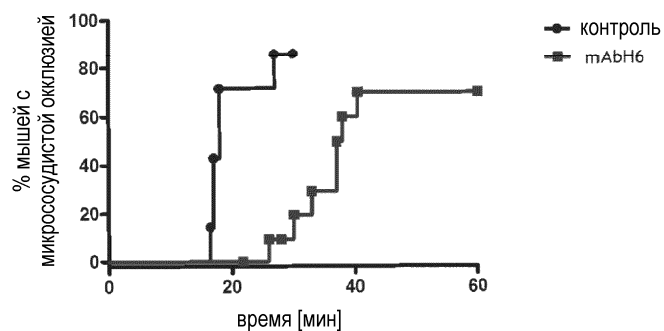
Гемолиз эритроцитов CD55/59-/- мышей при воздействии сыворотки человека



Фиг. 42

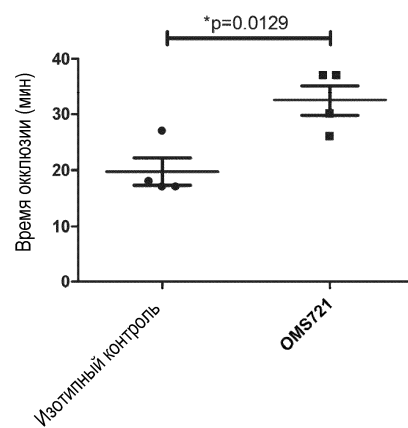


mAbH6 ингибирует тромбообразование в экспериментальной модели на мышах тромботической микроангиопатии, индуцированной с помощью FITC-декстран



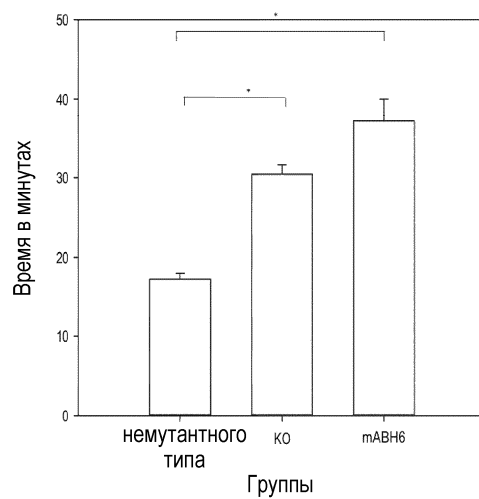
Фиг. 46

Обработка с помощью FITC

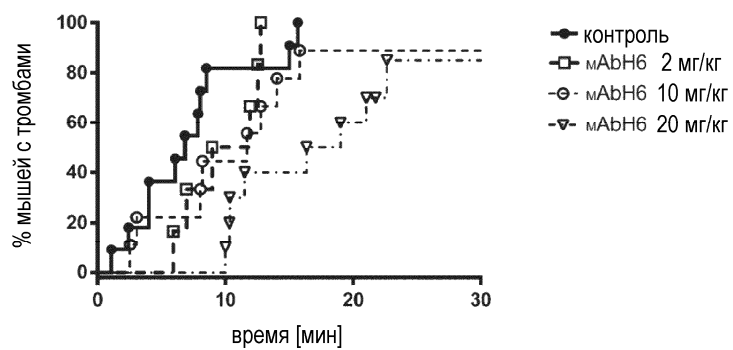


Фиг. 47

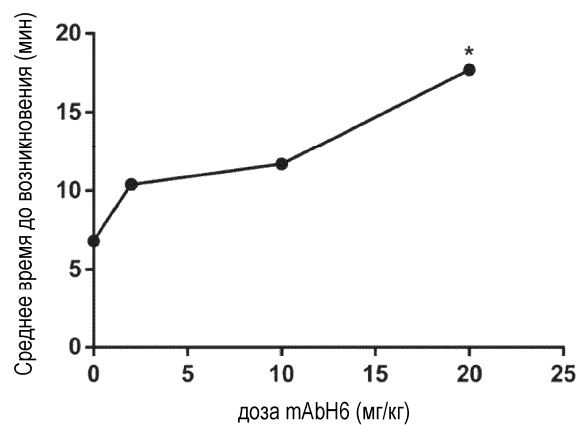
Время до возникновения окклюзии



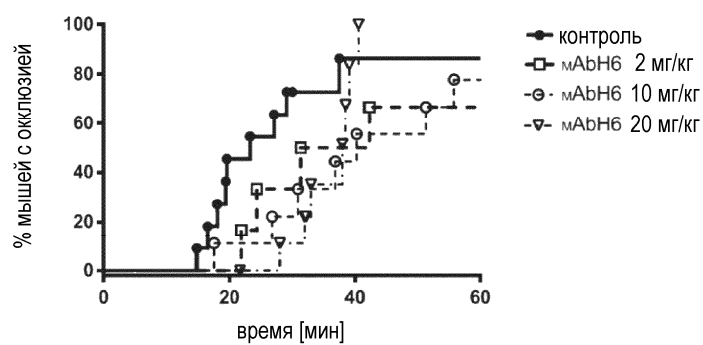
Фиг. 48



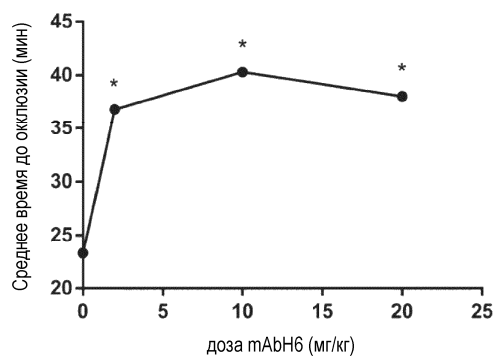
Фиг. 49



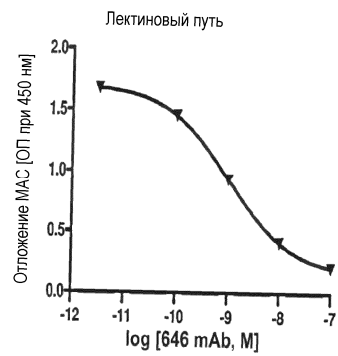
Фиг. 50



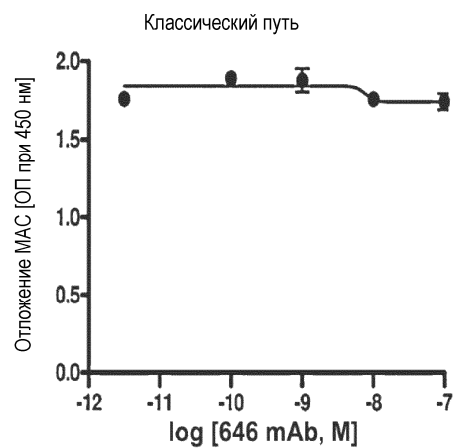
Фиг. 51



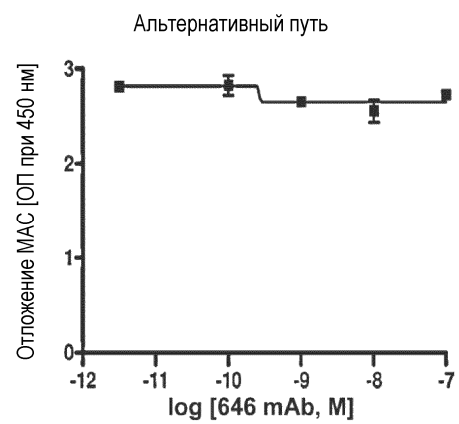
Фиг. 52



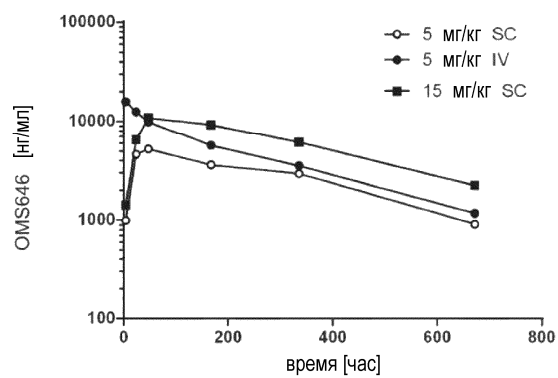
Фиг. 53А



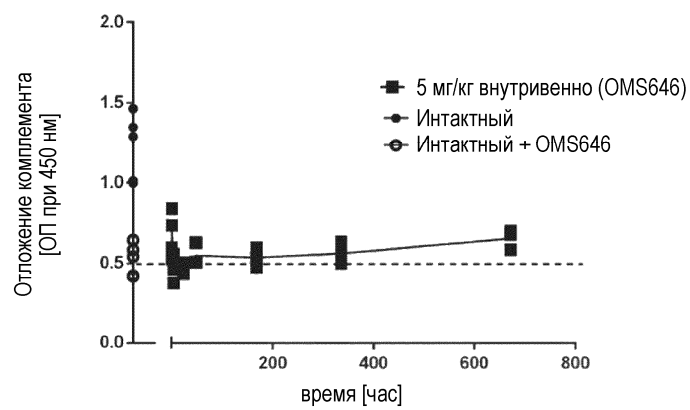
Фиг. 53В



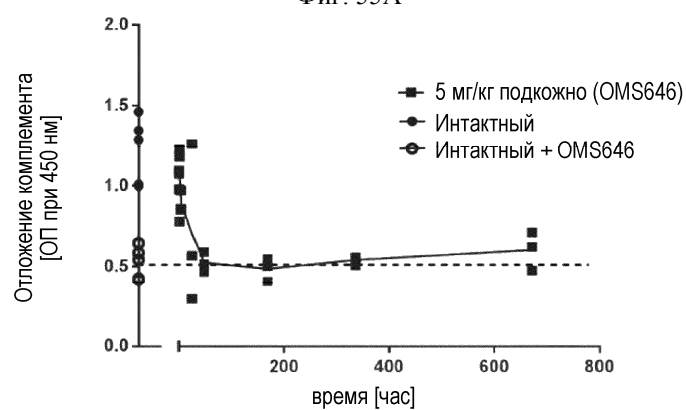
Фиг. 53С



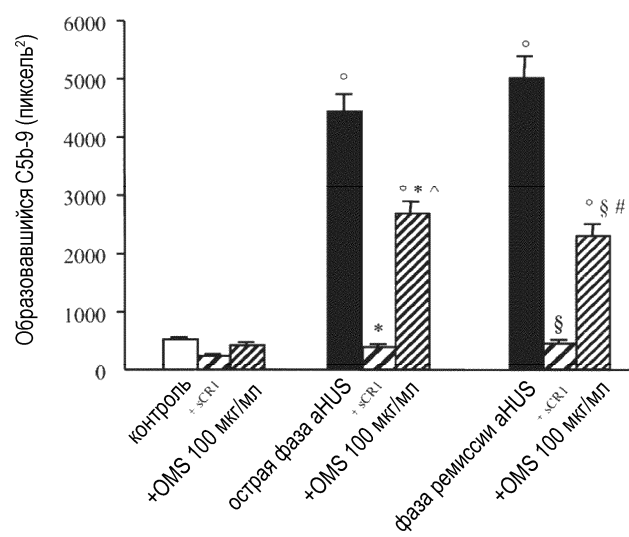
Фиг. 54



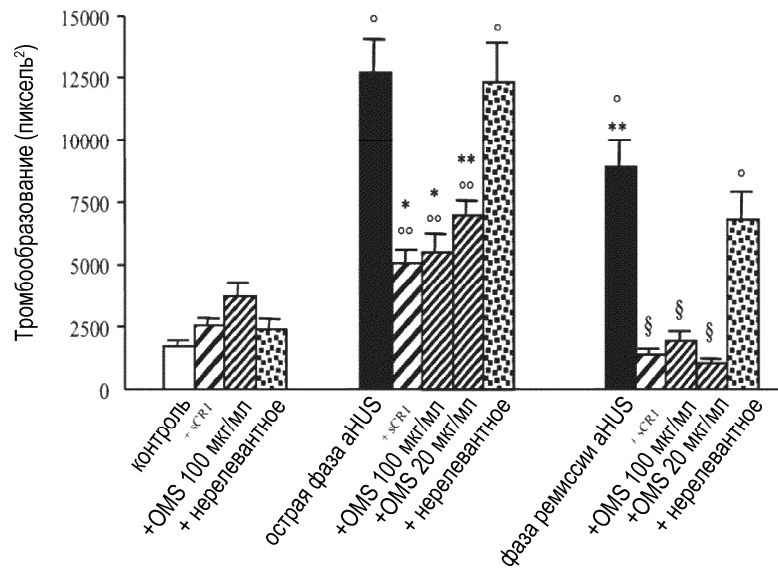
Фиг. 55А



Фиг. 55В

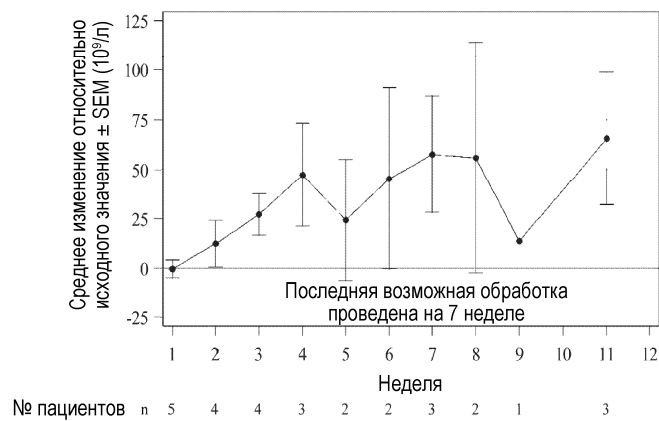


Фиг. 56



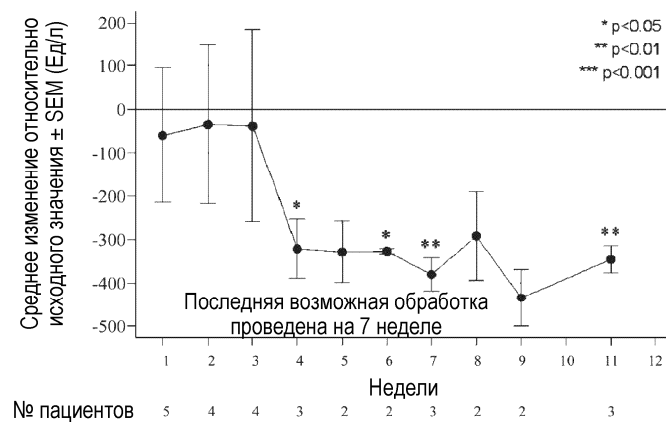
Фиг. 57

Изменение количества тромбоцитов относительно
исходного значения в течение времени



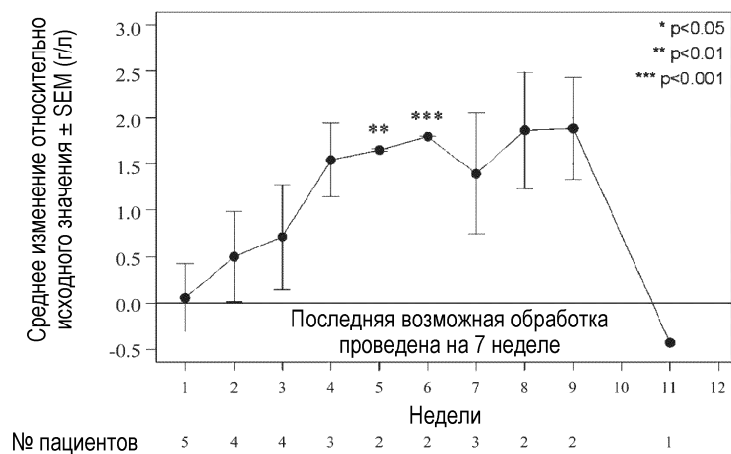
Фиг. 58

Изменение показателя LDH относительно исходного
значения в течение времени



Фиг. 59

Изменение показателя гаптоглобина в течение
времени



Фиг. 60



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2