

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043102**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.25**

**(21)** Номер заявки  
**201990903**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.10.12**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/7105* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 45/00* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)

**(54) СПОСОБ УМЕНЬШЕНИЯ ПРОТЕИНУРИИ У ЧЕЛОВЕКА, СТРАДАЮЩЕГО ОТ ИММУНОГЛОБУЛИН А НЕФРОПАТИИ**

**(31)** 62/407,979; 15/399,524; 15/470,647;  
62/527,926

**(32)** 2016.10.13; 2017.01.05; 2017.03.27;  
2017.06.30

**(33)** US

**(43)** 2020.01.27

**(86)** PCT/US2017/056386

**(87)** WO 2018/071701 2018.04.19

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

**(72)** Изобретатель:  
**Бранскилл Найджел Джон (GB),**  
**Демопулос Грегори А., Дадлер Том**  
**(US), Швебле Ханс-Вильхельм (GB)**

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

**(56)** US-A1-20150166675  
US-A1-20140127224  
TANG et al.: "Mycophenolate Mofetil  
Alleviates Persistent Proteinuria in IgA Nephropathy",  
Kidney International, 31 August 2005 (31.08.2005),  
vol. 68, pgs. 802-812, entire document

US-A1-20170189525  
US-B2-9096676

RICKLIN et al.: "Complement in Immune and  
Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions",  
The Journal of Immunology, 15 April 2013  
(15.04.2013), vol. 190, pgs. 3839-3847, entire  
document

US-A1-20110311549

ROOS et al.: "Glomerular Activation of the  
Lectin Pathway of Complement in IgA Nephropathy is  
Associated with More Severe Renal Disease", Journal  
of the American Society of Nephrology, 01 June  
2006 (01.06.2006), vol. 17, pgs. 1724-1734, entire  
document

**(57)** В одном из аспектов изобретение относится к способам уменьшения протеинурии у человека, страдающего или подверженного риску развития иммуноглобулин А нефропатии (IgAN). Способы включают этап введения нуждающемуся в этом субъекту количества ингибирующего MASP-2 антитела, эффективного для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

**B1****043102****043102****B1**

### Заявление в отношении списка последовательности

Список последовательностей, связанный с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящую заявку посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, назван MP\_1\_0269\_PCT\_Sequence\_Listing\_20171013\_ST25. Текстовый файл имеет размер 136 КБ, был создан 10 октября 2017 г. и доступен через EFS-Web с момента подачи описания.

### Уровень техники

У людей и других позвоночных система комплемента обеспечивает механизм раннего действия по инициации, амплификации и регуляции иммунного ответа на микробную инфекцию и другие острые инфекции (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York). Хотя активация комплемента обеспечивает важную первую линию защиты от потенциальных патогенов, активность комплемента, которая стимулирует формирование защитного иммунного ответа, может также представлять потенциальную угрозу для хозяина (K.R. Kalli et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 15:41-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical. Investig.*, 24:219-228, 1994). Например, протеолитические продукты C3 и C5 стимулируют рекрутирование и активацию нейтрофилов. Хотя нейтрофилы необходимы для защиты хозяина, активированные нейтрофилы не избирательны по высвобождению ими деструктивных ферментов и могут вызывать повреждение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать отложение литических компонентов комплемента на соседних клетках-хозяевах, а также на микробных мишенях, приводя к лизису клеток-хозяев.

Система комплемента также участвует в патогенезе многочисленных острых и хронических заболеваний, включая инфаркт миокарда, инсульт, РДСВ, реперфузионное повреждение, септический шок, капиллярную утечку после термических ожогов, воспаление после операции по кардиопульмональному шунтированию, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, множественный склероз, миастению и болезнь Альцгеймера. Почти при всех этих состояниях сам комплемент не вызывает эти состояния, но является одним из нескольких факторов, участвующих в патогенезе. Тем не менее активация комплемента может быть основным патологическим механизмом и представляет собой эффективное звено для клинического контроля при многих указанных болезненных состояниях. Все возрастающее признание важного значения в понимании механизмов опосредованного комплементом поражения тканей при различных болезненных состояниях еще раз указывает на необходимость в разработке эффективных лекарственных веществ, ингибирующих комплемент. На сегодняшний день Экулизумаб (Solaris® (Соларис)), т.е. анти-C5 антитело, является единственным лекарственным средством, нацеленным на комплемент, одобренным для использования человеком. Тем не менее C5 является одной из нескольких эффекторных молекул, действующих на "поздних" этапах системы комплемента и блокада C5 не приводит к подавлению активации системы комплемента. Следовательно, ингибитор этапов инициации активации комплемента имел бы существенное преимущество по сравнению с ингибитором компонента комплемента, действующим на поздних этапах.

В настоящее время общепризнано, что система комплемента может быть активирована тремя различными путями: классическим, лектиновым и альтернативным. Классический путь обычно запускается комплексом, состоящим из антител хозяина, связанных с чужеродной частицей (т.е. антигеном), и, следовательно, требует предварительного воздействия антигена для генерации специфического ответа антитела. Поскольку активация классического пути зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа иммунного ответа хозяина, классический путь является частью системы приобретенного иммунитета. В противоположность этому и лектиновый, и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунитета и являются частью системы врожденного иммунитета.

Активация системы комплемента приводит к последовательной активации зимогенов сериновой протеазы. Первым этапом активации классического пути является связывание молекулы специфического распознавания C1q с антигенсвязанными молекулами IgG и IgM. C1q ассоциирован с проферментами сериновой протеазы C1r и C1s в виде комплекса, называемого C1. При связывании C1q с иммунным комплексом аутопротеолитическое расщепление Arg-Ile сайта C1r сопровождается опосредованным C1r расщеплением и активацией C1s, таким образом обеспечивая способность расщеплять C4 и C2. C4 расщепляется на два фрагмента, обозначенные C4a и C4b, и C2 аналогично расщепляется на C2a и C2b. Фрагменты C4b могут образовывать ковалентные связи с соседними гидроксильными группами или аминокислотными группами и генерировать C3-конвертазу (C4b2a) посредством нековалентного взаимодействия с фрагментом C2a активированного C2. C3-конвертаза (C4b2a) активирует C3 посредством протеолитического расщепления на субкомпоненты C3a и C3b, приводя к образованию C5-конвертазы (C4b2a3b), которая через расщепление C5 приводит к образованию мембраноатакующего комплекса (C5b вместе с C6, C7, C8 и C9, также называемого "MAC"), который может разрушать клеточные мембраны, приводя к лизису клеток. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) в результате ковалентного связывания осаждаются на поверхностях чужеродных мишеней, которые распознаются рецепторами комплемента на многих фагоцитах.

Независимо от этого первым этапом активации системы комплемента по лектиновому пути также является связывание молекул специфического распознавания, после которого происходит активация

проферментов, ассоциированных с сериновой протеазой. Однако вместо связывания иммунных комплексов посредством C1q молекулы распознавания в лектиновом пути содержат группу углеводсвязывающих белков (маннансвязывающий лектин (MBL), Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и лектин С-типа CL-11), известных под общим названием лектины. См. 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 J. Luet et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology*, 101:225-232 (2000); Hansen et al., *J. Immunol.*, 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda et al. впервые продемонстрировали, что MBL, подобно C1q, может активировать систему комплемента после связывания с эритроцитами, покрытыми дрожжевым маннаном, по C4-зависимому механизму (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.*, 2(52):7451-7454, (1987)). MBL, член семейства белков коллектинов, представляет собой кальцийзависимый лектин, который связывается с углеводами по 3- и 4-гидроксигруппам, ориентированным в горизонтальной плоскости пиранозного кольца. Таким образом, основными лигандами для MBL являются D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, а углеводы, не удовлетворяющие этому стерическому требованию, имеют обнаруживаемое сродство к MBL (Weis et al., *Nature*, 360:127-134 (1992)). Взаимодействие между MBL и моновалентными сахарами является очень слабым с константами диссоциации, обычно находящимися в одноразрядном миллимолярном диапазоне. Сильное, специфическое связывание MBL с гликановыми лигандами достигается за счет avidности, т.е. взаимодействия одновременно со множеством остатков моносахаридов, локализованных в непосредственной близости друг от друга (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.*, 299:129-136 (1992)). MBL распознает углеводные паттерны, как правило, образуемые микроорганизмами, такими как бактерии, дрожжи, паразиты и определенные вирусы. В отличие от этого MBL не распознает D-галактозу и сиаловую кислоту, предпоследние и последние сахара, как правило, содержащиеся в "зрелых" сложных гликоконъюгатах, присутствующих на клеточной поверхности и в плазме млекопитающих. Считается, что эта специфичность связывания способствует распознаванию "чужеродных" поверхностей и помогает защищать от "аутоактивации". Однако MBL не связывается с высоким сродством с кластерами "предшественников" гликанов с высоким содержанием маннозы на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, секвестрированных в эндоплазматической сети и в аппарате Гольджи клеток млекопитающих (Maynard et al., *J. Biol. Chem.*, 257:3788-3794 (1982)). Таким образом, поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для активации лектинового пути посредством связывания с MBL.

Фиколины содержат лектиновый домен, отличающийся от лектинового домена MBL, называемым фибриногеноподобным доменом. Фиколины связываются с остатками сахаров  $\text{Ca}^{++}$ -независимым способом. У человека были идентифицированы фиколины трех видов (L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин). Два сывороточных фиколина, L-фиколин и Н-фиколин, имеют общую специфичность к N-ацетил-D-глюкозамину, однако Н-фиколин также связывается и с N-ацетил-D-галактозамином. Разница в специфичности к сахарам L-фиколина, Н-фиколина, CL-11 и MBL означает, что различные лектины могут быть комплементарными и воздействовать на различные, пусть даже перекрывающиеся гликоконъюгаты. Эта концепция подтверждается последними сообщениями в литературе о том, что из известных лектинов в лектиновом пути, только L-фиколин специфически связывается с липотейхоевой кислотой, т.е. гликоконъюгатом клеточной стенки, обнаруженных у всех грамположительных бактерий (Lynch, N.J. et al., *J. Immunol.*, 172:1198-1202, 2004). Коллектины (т.е. MBL) и фиколины не имеют значимого сходства по аминокислотным последовательностям. Однако эти две группы белков имеют одинаковую организацию доменов и, подобно C1q, собираются в олигомерные структуры, что максимально увеличивает возможность мультисайтового связывания.

Концентрации MBL в сыворотке сильно варьируют в популяциях здоровых индивидуумов и генетически контролируются полиморфизмами/мутациями в промоторе и кодирующих областях гена MBL. Экспрессия MBL, как белка острой фазы, дополнительно усиливается при воспалении. L-фиколин присутствует в сыворотке в концентрациях, аналогичных MBL. Следовательно, L-фиколиновая ветвь лектинового пути потенциально сравнима по своей силе с ветвью MBL. MBL и фиколины также функционируют как опсоины, позволяющие фагоцитам воздействовать 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 et al., *J. Exp. Med.*, 169:1733 (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem.*, 277:2448-54 (1996)), идентичность которых пока не установлена.

Специфическое и высокоаффинное взаимодействие человеческого MBL с уникальными C1r/C1s-подобными сериновыми протеазами, называемыми MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP) осуществляется через его коллагеноподобный домен. К настоящему моменту описано три MASP. Сначала был идентифицирован один фермент "MASP", который был охарактеризован как фермент, ответственный за инициацию каскада комплемента (т.е. расщепления C2 и C4) (Matsushita et al., *J. Exp. Med.*, 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol.*, 750:571-578 (1993)). Затем было определено, что активность MASP фактически представлена смесью двух протеаз: MASP-1 и MASP-2 (Thiel et al., *Nature*, 556:506-510 (1997)). Однако было показано, что для активации комплемента достаточно одного

комплекса MBL-MASP-2 (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol.*, 165:2093-2100 (2000)). Кроме того, только MASP-2 расщепляет C2 и C4 с высокой скоростью (Ambrus et al., *J. Immunol.*, 770:1374-1382 (2003)). Таким образом, MASP-2 является протеазой, ответственной за активацию C4 и C2 с образованием C3-конвертазы, C4b2a. Это является существенным отличием от комплекса C1 классического пути, где координированное действие двух специфических сериновых протеаз (C1r и C1s) приводит к активации системы комплемента. Кроме того, была выделена третья новая протеаза, MASP-3 (Dahl, M.R. et al., *Immunity*, 15:127-35, 2001). MASP-1 и MASP-3 являются продуктами альтернативного сплайсинга одного и того же гена.

Организация доменов MASP идентична таковой у C1r и C1s, являющихся ферментативными компонентами комплекса C1 (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 28:545 (2000)). Эти домены включают N-концевой C1r/C1s/VEGF морского ежа/домен 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 через расщепление Arg-Ile-связи, смежной с доменом сериновой протеазы, приводя к разделению фермента на цепи A и B, соединенные дисульфидной связью, где последняя состоит из домена сериновой протеазы.

MBL также может быть ассоциирован с альтернативно сплайсированной формой MASP-2, известной как MBL-ассоциированный белок размером 19 кДа (MAp19) или малый MBL-ассоциированный белок (sMAP), у которого отсутствует каталитическая активность MASP-2 (Stover, *J. Immunol.*, 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., *Int. Immunol.*, 11:859-863, (1999)). MAp19 содержит первые два домена MASP-2, за которыми следует дополнительная последовательность из четырех уникальных аминокислот. Функция MAp19 остается неясной (Degn et al., *J. Immunol. Methods*, 2011). Гены MASP-1 и MASP-2 локализованы на хромосомах 3 и 1 человека соответственно (Schwaebler et al., *Immunobiology*, 205:455-466 (2002)).

Существует ряд данных, позволяющих предположить, что различные комплексы MBL-MASP и большая фракция MASP в сыворотке не образуют комплексы с MBL (Thiel, S. et al., *J. Immunol.*, 165:878-887, 2000). Как H-, так и L-фиколин связываются со всеми MASP и, как и MBL, активируют лектиновый путь комплемента (Dahl, M.R. et al., *Immunity*, 15:127-35, 2001; Matsushita, M. et al., *J. Immunol.*, 165:3502-3506, 2002). Лектиновый и классические пути образуют общую C3-конвертазу (C4b2a), и на этом этапе эти два пути сходятся.

Существует широко распространенное мнение, что лектиновый путь играет важную роль в защите неинфицированного хозяина от инфекции. Убедительные доказательства участия MBL в защите хозяина были получены из анализа пациентов со сниженными уровнями функционального MBL в сыворотке (Kilpatrick, D.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1572:401-413, 2002). У этих пациентов наблюдается восприимчивость к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Такие симптомы обычно появляются в раннем возрасте, в пределах очевидного "окна уязвимости", когда происходит снижение титров материнских антител до тех пор, пока не сформируется полный репертуар антител. Этот синдром часто является результатом мутаций в нескольких сайтах в коллагеновой части MBL, которые препятствуют правильному образованию олигомеров MBL. Однако, поскольку MBL может функционировать как опсонин независимо от комплемента, то неизвестно, в какой степени повышение чувствительности к инфекции обусловлено снижением активации комплемента.

Считается, что все три пути (т.е. классический, лектиновый и альтернативный) сходятся в C5, который расщепляется с образованием продуктов с многочисленными провоспалительными эффектами. Путь, в котором сходятся все три пути, был определен как терминальный путь комплемента. C5a представляет собой самый сильный анафилотоксин, индуцирующий изменение тонуса гладких мышц и сосудов, а также проницаемости сосудов. Он также является мощным хемотаксином и активатором нейтрофилов и моноцитов. C5a-опосредованная активация клеток может значительно усиливать воспалительные ответы путем индуцирования высвобождения множества дополнительных медиаторов воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и частицы активного кислорода. Расщепление C5 приводит к образованию C5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (MAC). В настоящее время существуют убедительные доказательства того, что сублитическое отложение MAC, помимо его роли в качестве литического порообразующего комплекса, может играть важную роль в воспалительном процессе.

Дополнительно к своей важной роли в иммунной защите система комплемента участвует в поражении тканей при многих клинических состояниях. Несмотря на наличие множества данных, указывающих на участие классического и альтернативного путей комплемента в патогенезе неинфекционных заболеваний у человека, роль лектинового пути в таком патогенезе начали оценивать только сейчас. Недавние исследования показали, что активация лектинового пути может быть ответственна за активацию комплемента и связанное с ним воспаление при ишемическом/реперфузионном повреждении. Collard et al. (2000) показали, что культивируемые эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связываются с MBL и демонстрируют отложение C3 в ответ на воздействие человеческой сыворотки (Collard et al., *Am. J. Pathol.*, 156:1549-1556 (2000)). Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими моноклональными анти-MBL антителами подавляла связывание MBL и активацию комплемента. Эти данные подтверждали на крысиной модели ишемии/реперфузии миокарда, при которой у

крыс, получивших блокирующие антитела к крысиному MBL, наблюдалось значимое снижение повреждения миокарда на фоне окклюзии коронарной артерии, по сравнению с крысами, получавшими контрольное антитело (Jordan, J.E. et al., *Circulation*, 104:1413-1418, 2001). Молекулярный механизм связывания MBL с сосудистым эндотелием после окислительного стресса остается пока неясным, однако последние исследования позволяют предположить, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием MBL с сосудистыми эндотелиальными цитокератинами, а не с гликоконъюгатами (Collard, C.D. et al., *Am. J. Pathol.*, 159:1045-1054, 2001). Другие исследования указали на роль классического и альтернативного путей в патогенезе ишемического/реперфузионного повреждения, а роль лектинового пути в патогенезе такого заболевания, пока остается предметом дискуссии (Riedermann, N.C. et al., *Am. J. Pathol.*, 162:363-367, 2003).

Фиброз представляет собой образование избыточного количества соединительной ткани в органе или ткани, образуемое, как правило, в ответ на повреждение или поражение. Отличительным признаком фиброза является продуцирование избыточного внеклеточного матрикса после локальной травмы. Нормальный физиологический ответ на поражение приводит к образованию соединительной ткани, но этот изначально целебный процесс восстановления может затянуться и стать патологическим, изменяя архитектуру и функцию ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты размножаются и дифференцируются в миофибробласты, приводя к сокращению матрикса, увеличению ригидности, микроваскулярной компрессии и гипоксии. Приток воспалительных клеток, включая макрофагов и лимфоцитов, приводит к высвобождению цитокинов и усиливает отложение коллагена, фибронектина и других молекулярных маркеров фиброза. Традиционные терапевтические подходы в основном были направлены на воспалительный процесс при фиброзе с использованием кортикостероидов и иммунодепрессантов. К сожалению, все эти противовоспалительные агенты имеют небольшой клинический эффект. В настоящее время отсутствует эффективное лечение или терапия фиброза, однако и отчеты исследований на животных, и эпизодические отчеты о результатах лечения людей говорят о том, что фиброзные поражения тканей могут быть купированы (Tampe and Zeisberg, *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 10:226-237, 2014).

Почка имеет ограниченную способность к восстановлению после травмы. Различные патологии почек приводят к местному воспалению, которое вызывает рубцевание и фиброз почек. Непрерывающееся воздействие воспалительных стимулов приводит к тубулоинтерстициальному воспалению и фиброзу, и прогрессирующему функциональному нарушению почек при хроническом заболевании почек. Его прогрессирование до терминальной стадии почечной недостаточности связано со значительным уровнем заболеваемости и смертности. Поскольку тубулоинтерстициальный фиброз является общей терминальной точкой многих почечных патологий, он представляет собой важную мишень для лечения, направленного на предотвращение почечной недостаточности. Факторы риска (например, протеинурия), независимые от первичного заболевания почек, способствуют развитию фиброза почек и потере экскреторной функции почек, стимулируя развитие местного воспаления, что, в свою очередь, усиливает прогрессирование заболевания.

Учитывая роль фиброза во многих заболеваниях и расстройствах, таких как, например, тубулоинтерстициальный фиброз, приводящий к хроническому заболеванию почек, существует настоятельная необходимость в разработке терапевтически эффективных средств для лечения заболеваний и состояний, вызванных или осложненных фиброзом. Также учитывая недостаток в новых и существующих методах лечения, воздействующих на воспалительные профиброзные факторы при почечных заболеваниях, необходимо разработать терапевтически эффективные средства для лечения, подавления, профилактики и/или купирования фиброза почек, тем самым предотвращения прогрессирования хронического заболевания почек.

### Сущность изобретения

Этот раздел описания предназначен для введения набора понятий, представленных в упрощенном виде, которые более подробно описаны ниже. Этот раздел описания не предназначен для определения ключевых признаков заявленного объекта изобретения и не предназначен для определения объема заявленного объекта изобретения.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения, подавления, облегчения или профилактики фиброза у млекопитающего, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, включающему введение субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для подавления фиброза. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент избирательно подавляет активацию лектинового пути комплемента без подавления по существу активации C1q-зависимого комплемента. В одном из вариантов осуществления субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным по меньшей мере одним из следующего:

- (i) фиброза и/или воспаления, связанного с ишемическим реперфузионным повреждением;
- (ii) фиброза и/или воспаления почек (например, тубулоинтерстициального фиброза, хронического за-

болевания почек, хронической почечной недостаточности, гломерулярного заболевания (например, фокального сегментарного гломерулосклероза), нарушения иммунного комплекса (например, IgA-нефропатии, мембранозной нефропатии), волчаночного нефрита, нефротического синдрома, диабетической нефропатии, тубулоинтерстициального поражения и гломерулонефрита (например, С3-гломерулопатии);

(iii) фиброза и/или воспаления легких (например, хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, фиброза легких, связанного со склеродермией, бронхоэктаза и легочной гипертензии);

(iv) фиброза и/или воспаления печени (например, цирроза, неалкогольной жировой болезни печени (стеатогепатита)), фиброза печени, вторичного по отношению к злоупотреблению алкоголем, фиброза печени, вторичного по отношению к острому или хроническому гепатиту (лекарственно-индуцированной гепатотоксичности, вызванной ацетаминофеном или другим лекарственным средством);

(v) фиброза и/или воспаления сердца (например, сердечного фиброза, инфаркта миокарда, фиброза клапана, фиброза предсердия, фиброза эндомикарда, аритмической кардиомиопатии правого желудочка (АКПХ));

(vi) сосудистого фиброза (например, сосудистого заболевания, атеросклеротического сосудистого заболевания, стеноза сосудов, рестеноза, васкулита, флебита, тромбоза глубоких вен и аневризмы брюшной аорты);

(vii) фиброза кожи (например, чрезмерного заживления ран, склеродермии, системного склероза, келоидов, заболевания соединительной ткани, рубцевания и гипертрофических рубцов);

(viii) фиброза суставов (например, артрофиброза);

(ix) фиброза центральной нервной системы (например, инсульта, травматического повреждения головного мозга и травмы спинного мозга);

(x) фиброза пищеварительной системы (например, болезни Крона, фиброза поджелудочной железы и язвенного колита);

(xi) глазного фиброза (например, передней субкапсулярной катаракты, помутнения задней капсулы, дегенерации желтого пятна и ретиальной и витреальной ретинопатии);

(xii) фиброза структур мягких тканей скелетно-мышечной системы (например, клеточного капсулита, контрактуры Дюпуйтрена и миелофиброза);

(xiii) фиброза репродуктивных органов (например, эндометриоза и болезни Пейрони);

(xiv) хронического инфекционного заболевания, которое вызывает фиброз и/или воспаление (например, альфа-вируса, гепатита А, гепатита В, гепатита С, туберкулеза, ВИЧ и гриппа);

(xv) аутоиммунного заболевания, которое вызывает фиброз и/или воспаление (например, склеродермии и системной красной волчанки (СКВ));

(xvi) рубцевания, связанного с травмой (например, где связанные с травмой рубцы выбирают из группы, состоящей из хирургических осложнений (например, послеоперационных спаек, при которых может образовываться рубцовая ткань между внутренними органами, вызывающими контрактуру, боль и может приводить к бесплодию), индуцированного химиотерапевтическими средствами фиброза, индуцированного радиацией фиброза и рубцевания, связанного с ожогами); или

(xvii) трансплантации органов, фиброза молочной железы, мышечного фиброза, ретроперитонеального фиброза, фиброза щитовидной железы, фиброза лимфатических узлов, фиброза мочевого пузыря и плеврального фиброза.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения, подавления, облегчения или профилактики фиброза почек у млекопитающего, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением почек, включающему введение субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для подавления фиброза почек. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления MASP-2 антитело или его фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, со средством по меньшей мере в 10 раз превышающим, средство связывания с другим антигеном в системе комплемента. В одном из вариантов осуществления антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент избирательно подавляет активацию лектинового пути комплемента без подавления по существу активации C1q-зависимого комплемента. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят подкожно, интраперитонеально, внутримышечно, внутриаартериально, внутривенно или путем ингаляции. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для подавления тубулоинтерстициального фиброза. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для уменьшения, задержки или устранения необходимости в диализе у субъекта. В одном из вариантов осуществления субъект страдает заболеванием почек или заболеванием, выбранным из группы, состоящей из хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности, гломерулярного заболевания (например, фокального сегментарного

гломерулосклероза), волчаночного нефрита, нефротического синдрома, диабетической нефропатии, тубулоинтерстициального поражения и гломерулонефрита (например, С3-гломерулопатии). В одном из вариантов осуществления субъект страдает протеинурией и ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для уменьшения тяжести протеинурии у субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения (например, по меньшей мере 30% уменьшения, или по меньшей мере 40% уменьшения, или по меньшей мере 50% уменьшения) 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления субъект страдает заболеванием или расстройством почек, ассоциированным с протеинурией, выбранной из группы, состоящей из нефротического синдрома, преэклампсии, эклампсии, токсического поражения почек, амилоидоза, сосудисто-коллагенозных заболеваний (например, системной красной волчанки), обезвоживания, гломерулярных заболеваний (например, мембранозного гломерулонефрита, фокального сегментарного гломерулонефрита, С3-гломерулопатии, болезни минимальных изменений, липоидного нефроза), интенсивной физической нагрузки, стресса, доброкачественной ортостатической (постуральной) протеинурии, фокального сегментарного гломерулосклероза, IgA-нефропатии (например, болезни Бергера), IgM-нефропатии, мембрано-пролиферативного гломерулонефрита, мембранозной нефропатии, болезни минимальных изменений, саркоидоза, синдрома Альпорта, сахарного диабета (диабетической нефропатии), лекарственно-индуцированной токсичности (например, индуцированной НПВП, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами, ингибиторами АПФ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином) или другими нефротоксинами)); болезни Фабри, инфекции (например, ВИЧ, сифилиса, гепатита А, В или С, постстрептококковой инфекции, мочевого шистосомоза); аминокислотурии, синдрома Фанкони, гипертонического нефросклероза, интерстициального нефрита, серповидноклеточной болезни, гемоглобинурии, множественной миеломы, миоглобинурии, отторжения органов (например, отторжения трансплантата почки), геморрагической лихорадки эбола, синдрома ногтевой пателлы, семейной лихорадки, синдрома HELLP, системной красной волчанки, гранулематоза Вегенера, ревматоидного артрита, болезни накопления гликогена типа 1 (болезнь Гирке), синдрома Гудпасчера, пурпуры Шенляйна-Геноха, инфекции мочевых путей, распространившейся на почки, синдрома Шегрена и постинфекционного гломерулонефрита. В одном из вариантов осуществления субъект страдает IgA-нефропатией. В одном из вариантов осуществления субъект страдает мембранозной нефропатией.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставляется способ профилактики или уменьшения поражения почек у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с протеинурией, включающий введение количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для уменьшения или профилактики протеинурии у субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент избирательно подавляет активацию лектинового пути комплемента без подавления по существу активации C1q-зависимого комплемента. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией, выбирают из группы, состоящей из нефротического синдрома, преэклампсии, эклампсии, токсического поражения почек, амилоидоза, сосудисто-коллагенозных заболеваний (например, системной красной волчанки), обезвоживания, гломерулярных заболеваний (например, мембранозного гломерулонефрита, фокального сегментарного гломерулонефрита, С3-гломерулопатии, болезни минимальных изменений, липоидного нефроза), интенсивной физической нагрузки, стресса, доброкачественной ортостатической (постуральной) протеинурии, фокального сегментарного гломерулосклероза, IgA-нефропатии (например, болезни Бергера), IgM-нефропатии, мембрано-пролиферативного гломерулонефрита, мембранозной нефропатии, болезни минимальных изменений, саркоидоза, синдрома Альпорта, сахарного диабета (диабетической нефропатии), лекарственно-индуцированной токсичности (например, индуцированной НПВП, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами, ингибиторами АПФ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином)); болезни Фабри, инфекции (например, ВИЧ, сифилиса, гепатита А, В или С, постстрептококковой инфекции, мочевого шистосомоза); аминокислотурии, синдрома Фанкони, гипертонического нефросклероза, интерстициального нефрита, серповидноклеточной болезни, гемоглобинурии, множественной миеломы, миоглобинурии, отторжения органов (например, отторжения трансплантата почки), геморрагической лихорадки эбола, синдрома ногтевой пателлы, семейной лихорадки, синдрома HELLP, системной красной волчанки, гранулематоза Вегенера, ревматоидного артрита, болезни накопления гликогена типа 1, синдрома Гудпасчера, пурпуры Шенляйна-Геноха, инфекции мочевых путей, распространившейся на почки, синдрома Шегрена и постинфекционного гломерулонефрита. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения (например, по меньшей мере 30% уменьшения или по меньшей мере 40%

уменьшения, или по меньшей мере 50% уменьшения) 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставляется способ подавления прогрессирования хронического заболевания почек, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для уменьшения или профилактики фиброза почек, например, тубулоинтерстициального фиброза. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент избирательно подавляет активацию лектинового пути комплемента без подавления по существу активации C1q-зависимого комплемента. В одном из вариантов осуществления нуждающийся в этом субъект страдал протеинурией до введения ингибирующего MASP-2 агента, причем введение ингибирующего MASP-2 агента уменьшает протеинурию у субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения (например, по меньшей мере 30% уменьшения или по меньшей мере 40% уменьшения, или по меньшей мере 50% уменьшения) 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для уменьшения, задержки или устранения необходимости в диализе у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставляется способ защиты почек от поражения почек у субъекта, который получал, получает или будет получать лечение одним или более нефротоксическими агентами, включающий введение количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для профилактики или облегчения лекарственно-индуцированной нефропатии. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент избирательно подавляет активацию лектинового пути комплемента без подавления по существу активации C1q-зависимого комплемента.

В одном из аспектов изобретения предоставляется способ лечения человека, страдающего иммуноглоблин А нефропатией (IgAN), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном из вариантов осуществления субъект страдает стероидзависимым IgAN. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с человеческим MASP-2. В одном из вариантов осуществления антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело по существу не подавляет активацию классического пути. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке со значением  $IC_{50}$  30 нМ или меньше. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта, имеющего стероидзависимую IgAN до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для улучшения функции почек. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

В другом аспекте изобретения предоставляется способ лечения человека, страдающего мембранозной нефропатией (МН), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном из вариантов осуществления субъект страдает стероидзависимой МН. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с человеческим MASP-2. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антиген-



связывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

В другом аспекте изобретения предоставляется способ лечения человека, страдающего волчаночным нефритом (ВН), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном из вариантов осуществления субъект страдает от стероидзависимого ВН. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с человеческим MASP-2. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

В другом аспекте изобретения предоставляется способ уменьшения протеинурии у человека, страдающего от IgAN, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69, в соответствии со следующими схемами дозирования:

- а) введение примерно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 до 4,4 мг/кг) указанного антитела страдающему от IgAN субъекту внутривенно раз в неделю в течение периода лечения, составляющего по меньшей мере 12 недель;
  - б) введение от примерно 180 мг до примерно 725 мг (т.е. от 162 до 797 мг) указанного антитела страдающему от IgAN субъекту внутривенно раз в неделю в течение периода лечения, составляющего по меньшей мере 12 недель,
- при этом способ уменьшает протеинурию у указанного субъекта.

#### Описание рисунков

Вышеизложенные аспекты и многие из сопутствующих преимуществ этого изобретения станут более понятными со ссылкой на приведенное ниже подробное описание со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую геномную структуру человеческого MASP-2.

Фиг. 2А представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую структуру доменов человеческого белка MASP-2.

Фиг. 2В представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую структуру доменов человеческого белка MAp19.

Фиг. 3 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую стратегию нокаута мышинного MASP-2.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую конструкцию минигена MASP-2.

На фиг. 5А представлены результаты, демонстрирующие, что дефицит MASP-2 приводит к потере C4-опосредованной активации лектинового пути, определенной по отсутствию отложений C4b на маннанае, как описано в примере 2.

На фиг. 5В представлены результаты, демонстрирующие, что дефицит MASP-2 приводит к потере C4-опосредованной активации лектинового пути, определенной по отсутствию отложений C4b на зимозане, как описано в примере 2.

На фиг. 5С представлены результаты, демонстрирующие относительные уровни активации C4 в образцах сыворотки, полученных из MASP-2+/-, MASP-2-/- линий и линии дикого типа, определенные по отложению C4b на маннанае и на зимозане, как описано в примере 2.

На фиг. 6 представлены результаты, демонстрирующие, что добавление мышинового рекомбинантного MASP-2 к образцам MASP 2-/- сыворотки восстанавливает C4-опосредованную активацию лектинового пути, которая зависит от концентрации белка, определенную по отложению C4b на маннине, как описано в примере 2.

На фиг. 7 представлены результаты, демонстрирующие, что классический путь является функциональным у MASP-2-/- линии, как описано в примере 8.

На фиг. 8А представлены результаты, демонстрирующие, что анти-MASP-2 антитело Fab2 № 11 подавляет образование C3-конвертазы, как описано в примере 10.

На фиг. 8В представлены результаты, демонстрирующие, что анти-MASP-2 антитело Fab2 № 11 связывается с нативным крысиным MASP-2, как описано в примере 10.

На фиг. 8С представлены результаты, демонстрирующие, что анти-MASP-2 антитело Fab2 № 41 подавляет расщепление C4, как описано в примере 10.

На фиг. 9 представлены результаты, демонстрирующие, что все протестированные анти-MASP-2 антитела Fab2, которые подавляли образование C3-конвертазы, также подавляют расщепление C4, как описано в примере 10.

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

На фиг. 11 представлены результаты, демонстрирующие связывание анти-MASP-2 Fab2 № 40 и 60 с крысиными полипептидами MASP-2, как описано в примере 11.

На фиг. 12А графически показан уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях тестирования, специфических для лектинового пути, что свидетельствует о том, что OMS646 подавляет опосредованное лектином отложение MAC с величиной  $IC_{50}$ , равной примерно 1 нМ, как описано в примере 12.

На фиг. 12В графически показан уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях тестирования, специфических для классического пути, что свидетельствует о том, что OMS646 не подавляет опосредованное классическим путем отложение MAC, как описано в примере 12.

На фиг. 12С графически показан уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях тестирования, специфических для альтернативного пути, что свидетельствует о том, что OMS646 не подавляет опосредованное альтернативным путем отложение MAC, как описано в примере 12.

На фиг. 13 графически показан фармакокинетический (ПК) профиль человеческого моноклонального анти-MASP-2 антитела (OMS646) у мышей, показывающий концентрацию OMS646 (среднее значение для  $n=3$  животных/группа) в зависимости от времени после введения указанной дозы, как описано в примере 12.

На фиг. 14А графически показан фармакодинамический (PD) ответ моноклонального анти-MASP-2 антитела человека (OMS646), определенный по падению активности лектинового пути системы компонента у мышей после внутривенного введения, как описано в примере 12.

На фиг. 14В графически показан фармакодинамический (PD) ответ моноклонального MASP-2 антитела человека (OMS646), определенный по снижению активности лектинового пути системы компонента у мышей после подкожного введения, как описано в примере 12.

На фиг. 15 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным; срезы тканей получали у мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 16 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителами к маркеру макрофагов F4/80; срезы тканей получали у мышей дикого типа и MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 17 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК коллагена-4, измеренные количественной ПЦР (кПЦР) в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 18 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF $\beta$ -1), измеренные кПЦР в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 19 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК интерлейкина-6 (IL-6), измеренные кПЦР в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 20 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК интерферона- $\gamma$ , измеренные кПЦР, в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) и ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей, как описано в примере 14.

На фиг. 21 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным; срезы тканей получали через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) у мышей дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело и антитело изотипного контроля, как описано в примере 15.

На фиг. 22 графически показано содержание гидроксипролина в почках, полученных через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (UUO) у мышей дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, по сравнению с уровнем гидроксипролина в ткани окклюдированных почек, полученных от мышей дикого типа, получавших изотипный контроль, IgG4, как описано в примере 15.

На фиг. 23 графически показано общее количество сывороточных белков (мг/мл), измеренное на 15-й день изучения влияния передозировки белка у контрольных мышей дикого типа (n=2), получавших только физиологический раствор, мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=6), как описано в примере 16.

На фиг. 24 графически показано общее количество белка (мг), выделенного с мочой, собранной в течение 24-часов, на 15-й день изучения влияния передозировки белка у контрольных мышей дикого типа (n=2), получавших только физиологический раствор, мышей дикого типа, получавших BSA (n=6) и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=6), как описано в примере 16.

На фиг. 25 показаны репрезентативные срезы тканей почек, окрашенные гематоксилином и эозином (H&E), на 15-й день изучения уровня передозировки белка у следующих групп мышей: (панель A) контрольные мыши дикого типа; (панель B) MASP-2-/- контрольные мыши, (панель C) мыши дикого типа, получавшие BSA; и (панель D) MASP-2-/- мыши, получавшие бычий сывороточный альбумин (BSA), как описано в примере 16.

На фиг. 26 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителом к маркеру макрофагов F4/80, показывающие среднюю окрашенную площадь макрофагов (%), где срезы тканей получали на 15-й день изучения влияния передозировки белка у контрольных мышей дикого типа (n=2), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=5), как описано в примере 16.

На фиг. 27A графически показан анализ наличия корреляции между уровнем макрофагов и протеинурией у каждой мыши дикого типа (n=6), получавшей BSA, в виде графика зависимости общего количества выделенного белка, измеренного в 24-часовом образце мочи, от инфильтрации макрофагов (средняя окрашенная площадь, %), как описано в примере 16.

На фиг. 27B графически показан анализ наличия корреляции между уровнем макрофагов и протеинурией у каждой MASP-2-/- мыши (n=5), получавшей BSA, в виде графика зависимости общего количества выделенного белка, измеренного в 24-часовом образце мочи, от инфильтрации макрофагов (средняя окрашенная площадь, %), как описано в примере 16.

На фиг. 28 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-TGF $\beta$  антителом (измерено в виде площади окрашенных анти-TGF $\beta$  антител, выраженной в процентах) у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4) и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=5), как описано в примере 16.

На фиг. 29 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-TNF $\alpha$  антителом (измерено в виде площади окрашенных анти-TNF $\alpha$  антител) у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4) и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=5), как описано в примере 16.

На фиг. 30 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений участков тканей, окрашенных анти-IL-6 антителом (измерено в виде площади окрашенных анти-IL-6 антителом) у контрольных мышей дикого типа, контрольных MASP-2-/- мышей, мышей дикого типа, получавших BSA (n=7), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=7), как описано в примере 16.

На фиг. 31 графически показана частота TUNEL-положительных апоптотических клеток, подсчитанных в последовательно выбранных 20 полях зрения под большим увеличением (HPF) в срезах тканей почечного коркового вещества, полученных от контрольных мышей дикого типа (n=1), контрольных MASP-2-/- мышей (n=1), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=7), как описано в примере 16.

На фиг. 32 показаны репрезентативные срезы тканей, окрашенные H&E, полученные на 15-й день после лечения BSA следующих групп мышей: (панель A) контрольные мыши дикого типа, мыши, получавшие физиологический раствор; (панель B) мыши, получавшие антитело изотипного контроля, и (панель C) мыши дикого типа, получавшие ингибирующее MASP-2 антитело, как описано в примере 17.

На фиг. 33 графически показана частота TUNEL-положительных апоптотических клеток, подсчитанная в последовательно выбранных 20 полях зрения под большим увеличением (HPF) в срезах тканей

почечного коркового вещества, полученных от контрольных мышей дикого типа, получавших контрольный физиологический раствор и BSA (n=8), мышей дикого типа, получавших антитело изотипного контроля и BSA (n=8), и мышей дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело и BSA (n=7), как описано в примере 17.

На фиг. 34 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений участков тканей, окрашенных анти-TGFβ-антителом (измеренных в виде площади окрашенных анти-TGFβ антител, %) у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8), как описано в примере 17.

На фиг. 35 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных TNFα-антителом (измеренных в виде площади окрашенных анти-TNFα антител, %) у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8), как описано в примере 17.

На фиг. 36 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-IL-6 антителом (измеренных в виде площади окрашенных анти-IL-6 антител, %) у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8), как описано в примере 17.

На фиг. 37 показаны репрезентативные срезы тканей, окрашенные H&E, полученные на 14-й день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (контрольные) для следующих групп мышей: (панели A-1, A-2, A-3) контрольные мыши дикого типа, получавшие только физиологический раствор; (панели B-1, B-2, B-3) мыши дикого типа, получавшие адриамицин; и (панели C-1, C-2, C-3) MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин, как описано в примере 18.

На фиг. 38 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителом к маркеру макрофагов F4/80, показывающие среднюю окрашенную площадь макрофагов (%) на 14-й день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (контрольные мыши дикого типа) для следующих групп мышей: контрольные мыши дикого типа, получавшие только физиологический раствор; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; MASP-2-/- мыши, получавшие только физиологический раствор, и MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин, где \*\*p=0,007, как описано в примере 18.

На фиг. 39 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным, показывающие окрашенные области отложения коллагена (%) на 14-й день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (контрольные мыши дикого типа) для следующих групп мышей: контрольные мыши дикого типа, получавшие только физиологический раствор; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; MASP-2-/- мыши, получавшие только физиологический раствор, и MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин, где \*\*p=0,005, как описано в примере 18.

На фиг. 40 графически показано альбумин/креатинин соотношение в моче (uACR) у двух IgA пациентов в течение 12-недельного исследования с недельным лечением ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 19.

На фиг. 41 показан график зависимости величины uACR (мг/г) от времени для четырех IgAN пациентов, получавших OMS646, от начального момента до дня 120, как описано в примере 21.

На фиг. 42 графически показано изменение уровня белка в 24-часовом сборе мочи после лечения относительно исходного уровня в день 1 до лечения для четырех пациентов с IgAN, получавших OMS646, как описано в примере 21.

На фиг. 43 графически показано среднее изменение уровня белка в 24-часовом сборе мочи после лечения относительно исходного уровня до лечения для четырех пациентов с IgAN, получавших OMS646, как описано в примере 21.

#### Описание списка последовательностей

SEQ ID NO: 1 - κДНК человеческого MAp19.

SEQ ID NO: 2 - человеческий белок MAp19 (с лидерной последовательностью).

SEQ ID NO: 3 - человеческий белок MAp19 (зрелый).

SEQ ID NO: 4 - κДНК человеческого MASP-2.

SEQ ID NO: 5 - человеческий белок MASP-2 (с лидерной последовательностью).

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

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

Антигены: (по отношению к зрелому белку MASP-2).

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

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

SEQ ID NO: 10 - CUBEGFCUBII (aa 1-293).

SEQ ID NO: 11 - EGF-участок (aa 122-166).  
 SEQ ID NO: 12 - домен сериновой протеазы (aa 429-671).  
 SEQ ID NO: 13 - неактивный домен сериновой протеазы (aa 610-625 с заменой Ser618 на Ala).  
 SEQ ID NO: 14 - TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUBI).  
 SEQ ID NO: 15 - TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI).  
 SEQ ID NO: 16 - TFRSDYSN (центральная часть связывающего участка MBL).  
 SEQ ID NO: 17 - FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (связывающий участок MBL).  
 SEQ ID NO: 18 - IDECQVAPG (пептид EGF).  
 SEQ ID NO: 19 - ANMLCAGLES GGK DSCR GDSGGALV (центральная часть, связывающая сериновую протеазу).  
 Подробное описание.  
 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 - GLRGLQGPOGKLGPOG.  
 SEQ ID NO: 25 - GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOGPOGPO.  
 SEQ ID NO: 26 - GK DGRDGT KGEKGE PGQGLRGLQGPOGKLGPOG.  
 SEQ ID NO: 27 - GAOGSOG EKGAOGPGPOGPOGKMGPKGEOGDO (человеческий h-фиколин).  
 SEQ ID NO: 28 - GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (человеческий фиголин p35).  
 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', 12-45 нуклеотиды в SEQ ID NO: 4, включающей сайт начала инициации трансляции MASP-2 (смысловая).  
 SEQ ID NO: 32 - 5' GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG 3', 361-396 нуклеотиды в SEQ ID NO: 4, кодирующей участок, содержащий MBL-связывающий сайт MASP-2 (смысловая).  
 SEQ ID NO: 33 - 5' AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA 3', 610-642 нуклеотиды в SEQ ID NO: 4, кодирующей участок, содержащий домен CUBII.  
 Праймеры кодирования.  
 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 - праймеры клонирования для гуманизированного антитела.  
 SEQ ID NO: 48 - пептидную связь из 9 аминокислот.  
 Вектор экспрессии.  
 SEQ ID NO: 49 представляет собой вставку минигена MASP-2.  
 SEQ ID NO: 50 представляет собой кДНК мышинового MASP-2.  
 SEQ ID NO: 51 представляет собой мышинный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью).  
 SEQ ID NO: 52 представляет собой зрелый мышинный белок MASP-2.  
 SEQ ID NO: 53 представляет собой кДНК крысиного MASP-2.  
 SEQ ID NO: 54 представляет собой крысиный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью).  
 SEQ ID NO: 55 представляет собой зрелый крысиный белок MASP-2.  
 SEQ ID NO: 56-59 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза человеческого MASP-2, которые используются для получения человеческого MASP-2A.  
 SEQ ID NO: 60-63 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза мышинового MASP-2, которые используются для получения мышинового MASP-2A.  
 SEQ ID NO: 64-65 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза крысиного MASP-2, которые используются для получения крысиного MASP-2A.  
 SEQ ID NO: 66 представляет собой ДНК, кодирующую вариabельный участок тяжелой цепи (VH) 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646) (без сигнального пептида).  
 SEQ ID NO: 67 представляет собой полипептид 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646) вариabельного участка тяжелой цепи (VH).  
 SEQ ID NO: 68 представляет собой полипептид 17N16mc вариabельного участка тяжелой цепи (VH).  
 SEQ ID NO: 70 представляет собой ДНК, кодирующую вариabельный участок легкой цепи (VL) 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646).  
 SEQ ID NO: 69 представляет собой полипептид 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646) вариabельного участка легкой цепи (VL).  
 SEQ ID NO: 71 представляет собой полипептид 17N16\_dc17N9 вариabельного участка легкой цепи (VL).

SEQ ID NO: 72 представляет собой SGMI-2L (полноразмерный).

SEQ ID NO: 73 представляет собой SGMI-2M (укороченный вариант средней длины).

SEQ ID NO: 74 представляет собой SGMI-2S (укороченный вариант, короткий).

SEQ ID NO: 75 представляет собой зрелый полипептид, содержащий VH-M2ab6-SGMI-2-N и константную область человеческого IgG4 с мутацией в шарнирной области.

SEQ ID NO: 76 представляет собой зрелый полипептид, содержащий VH-M2ab6-SGMI-2-C и константную область человеческого IgG4 с мутацией в шарнирной области.

SEQ ID NO: 77 представляет собой зрелый полипептид, содержащий VL-M2ab6-SGMI-2-N и константную область цепи лямбда человеческого Ig.

SEQ ID NO: 78 представляет собой зрелый полипептид, содержащий VL-M2ab6-SGMI-2-C и константную область цепи лямбда человеческого Ig.

SEQ ID NO: 79 представляет собой пептидный линкер (10 aa).

SEQ ID NO: 80 представляет собой пептидный линкер (6 aa).

SEQ ID NO: 81 представляет собой пептидный линкер (4 aa).

SEQ ID NO: 82 представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VH-M2ab6-SGMI-2-N и константную область человеческого IgG4 с мутацией в шарнирной области.

SEQ ID NO: 83 представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VH-M2ab6-SGMI-2-C и константную область человеческого IgG4 с мутацией в шарнирной области.

SEQ ID NO: 84 представляет полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VL-M2ab6-SGMI-2-N и константную область цепи лямбда человеческого Ig.

SEQ ID NO: 85 представляет полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VL-M2ab6-SGMI-2-C и константную область цепи лямбда человеческого Ig.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии авторов настоящего изобретения, что ингибирование маннансвязывающей лектинассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2), ключевого регулятора лектинового пути системы комплемента, в значительной степени уменьшает воспаление и фиброз в различных моделях животных фиброзного заболевания, включая модель односторонней обструкции мочеточника (UUO), модель передозировки белка и модель фиброза почек при индуцированной адриамицином нефропатии. Таким образом, авторы изобретения продемонстрировали, что подавление MASP-2-опосредованной активации лектинового пути обеспечивает эффективный терапевтический подход для облегчения, лечения или профилактики фиброза почек, например тубулоинтерстициального воспаления и фиброза, независимо от основной причины. В настоящем описании также показано, что применение ингибирующего MASP-2 антитела (OMS646) эффективно улучшает функции почек и уменьшает потребность в кортикостероидах у людей, страдающих иммуноглобулин А нефропатией (IgAN) и мембранозной нефропатией (МН).

#### **I. Определения.**

Если специально не указано иное, то все используемые в настоящем описании термины имеют такое же значение, которое является понятным специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Приведенные ниже определения предназначены для прояснения терминов, которые используются в описании и в формуле настоящего изобретения.

Используемый в настоящем описании термин "MASP-2-зависимая активация комплемента" относится к MASP-2-зависимой активации лектинового пути, которая происходит в физиологических условиях (т.е. в присутствии  $\text{Ca}^{++}$ ) и которая приводит к образованию C3-конвертазы C4b2a лектинового пути и накоплению продукта расщепления C3, такого как C3b, а далее образованию C5-конвертазы C4b2a(C3b)<sub>n</sub>, что, как было определено, является основной причиной опсонизации.

Используемый в настоящем описании термин "альтернативный путь" относится к активации комплемента, которая инициируется, например, зимозаном из клеточных стенок грибов и дрожжей, липополисахаридом (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий и кроличьими эритроцитами, а также множеством чистых полисахаридов, кроличьих эритроцитов, вирусов, бактерий, опухолевых клеток животных, паразитов и поврежденных клеток, и которая, как принято считать, возникает в результате спонтанного протеолитического расщепления фактора комплемента C3 с образованием C3b.

Используемый в настоящем описании термин "лектиновый путь" относится к активации комплемента, которая происходит посредством специфического связывания сывороточных и несывороточных карбогидратсвязывающих белков, включая маннансвязывающий лектин (MBL), CL-11 и фиколины (Н-фиколин, М-фиколин или L-фиколин).

Используемый в настоящем описании термин "классический путь" относится к активации комплемента, которая запускается антителом, связанным с инородной частицей, и для осуществления которой необходимо связывание с молекулой распознавания C1q.

Используемый в настоящем описании термин "ингибирующий MASP-2 агент" означает любой агент, который связывается или непосредственно взаимодействует с MASP-2 и эффективно подавляет MASP-2-зависимую активацию комплемента, включая анти-MASP-2 антитела и их MASP-2-связывающие фрагменты, натуральные и синтетические пептиды, малые молекулы, растворимые MASP-2 рецепторы,

ингибиторы экспрессии и выделенные натуральные ингибиторы; а также пептиды, которые при активации лектинового пути конкурируют с MASP-2 за связывание с другими молекулами распознавания (например, MBL, Н-фиколином, М-фиколином или L-фиколином), при этом этот термин не охватывает антитела, которые связываются с другими молекулами распознавания. Ингибирующие MASP-2 агенты, используемые в настоящем изобретении, могут снижать уровень MASP-2-опосредованной активации комплемента более чем на 20%, например более чем на 50%, например более чем на 90%. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент снижает уровень MASP-2-опосредованной активации комплемента более чем на 90% (т.е. уровень MASP-2-опосредованной активации комплемента будет в результате составлять только 10% или менее).

Используемый в настоящем описании термин "фиброз" означает образование или присутствие избыточной соединительной ткани на органе или ткани. Фиброз может возникнуть как ответная реакция в виде восстановления или замещения на стимул, такой как повреждение ткани или воспаление. Отличительным признаком фиброза является продуцирование избыточного внеклеточного матрикса. Нормальный физиологический ответ на повреждение приводит к образованию соединительной ткани, как составляющей процесса заживления, но это образование соединительной ткани может затянуться и стать патологическим, изменяя архитектуру и функцию ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты размножаются и дифференцируются в миофибробласты, приводя к сокращению матрикса, увеличению ригидности, микроваскулярной компрессии и гипоксии.

Используемый в настоящем описании термин "лечение фиброза у млекопитающего, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением" означает купирование, ослабление, облегчение или подавление фиброза у указанного млекопитающего.

Используемый в настоящем описании термин "протеинурия" означает наличие белка в моче человека в аномальном количестве, например, в количестве, превышающем 0,3 г белка в моче человека, собранной за 24 ч, или в концентрации, превышающей 1 г/л. В некоторых вариантах осуществления страдающий от протеинурии субъект относится к субъекту, например субъекту, страдающему от иммуноглобулин А (IgA) нефропатии, у которого количество белка в моче превышает 1,0 г белка в 24-часовом сборе мочи.

Используемый в настоящем описании термин "улучшение при протеинурии" или "уменьшение протеинурии" означает уменьшение у субъекта, страдающего протеинурией, 24-часовой экскреции белка с мочой по меньшей мере на 20%, например по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, например по меньшей мере на 50% или более по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до его лечения ингибирующим MASP-2 агентом. В одном из вариантов осуществления лечение ингибирующим MASP-2 агентом согласно способу по изобретению является эффективным в отношении уменьшения протеинурии у человека настолько, что достигается более чем 20% уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой или, например, более чем 30% уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой, или, например, более чем 40% уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой, или, например, более чем 50% уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" охватывает антитела и их фрагменты, полученные от любого производящего антитела млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека) или полученные с помощью гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии или трансгенных животных (или другими способами получения антител или фрагментов антител), где указанные антитела или их фрагменты специфически связываются с целевым полипептидом, таким как, например, MASP-2 его полипептидами или участками. Это не означает, что термин "антитело" ограничен указанными в настоящем описании источниками происхождения антител или способами их получения (например, с помощью гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных, синтеза пептидов и т.п.). Приводимые в качестве примера антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; мультивалентные, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела); гуманизованные антитела; мышиные антитела; химерные антитела; моноклональные антитела "мышь-человек", "мышь-примат", "примат-человек"; и анти-идиотипические антитела, которые могут быть интактными антителами, или их фрагменты. Используемый в настоящем описании термин "антитело" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, гибридные белки, включающие часть антитела вместе с антигенсвязывающим фрагментом с нужной специфичностью, гуманизированные антитела, химерные антитела и любые модифицированные конфигурации иммуноглобулиновых молекул, содержащих антигенсвязывающий участок или фрагмент (эпитоп-распознающий участок) с нужной специфичностью.

"Моноклональное антитело" означает гомогенную популяцию антител, в которой моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и не встречающихся в природе), которые участвуют 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')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их варианты, рекомбинантные белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую модифицированную конфигурацию иммуноглобулиновой молекулы, содержащую антигенсвязывающий фрагмент (эпитоп-распознающий участок) с нужной специфичностью и способностью связываться с эпитопом. Это не означает, что этот термин ограничен указанными в настоящем описании источниками происхождения антител или способами их получения (например, с помощью гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.п.). Этот термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением "антитело".

Используемый в настоящем описании термин "фрагмент антитела" относится к части, полученной или относящейся к полноразмерному антителу, такому как, например, анти-MASP-2 антитело, обычно включающей антигенсвязывающий или вариабельный участок этого антитела. Репрезентативные примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем описании "одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела содержит VH и VL-домены антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, Fv-полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> доменами, который позволяет scFv формировать нужную структуру для связывания антигена.

Используемый в настоящем описании термин "химерное антитело" представляет собой рекомбинантный белок, который содержит вариабельные домены и определяющие комплементарность области, полученные из нечеловеческого (например, грызуна) антитела, тогда как остальная часть молекулы антитела получена из человеческого антитела.

Используемый в настоящем описании термин "гуманизированное антитело" представляет собой химерное антитело, содержащее минимальную последовательность, которая соответствует специфическим определяющим комплементарность областям, полученным из нечеловеческого иммуноглобулина, трансплантированного в каркас антитела человека. Гуманизированные антитела, как правило, представляют собой рекомбинантные белки, в которых только определяющие комплементарность области антитела имеют нечеловеческое происхождение.

Используемый в настоящем описании термин "маннансвязывающий лектин" ("MBL") является эквивалентным маннансвязывающему белку ("MBP").

Используемый в настоящем описании термин "мембраноатакующий комплекс" ("MAC") означает комплекс из пяти концевых компонентов комплемента (C5b, объединенный с C6, C7, C8 и C9), который встраивается в мембраны и разрушает их (также называемый C5b-9).

Используемый в настоящем описании термин "субъект" включает всех млекопитающих, включая без ограничения людей, приматов, не относящихся к человеку, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

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

В более широком смысле природные аминокислоты могут быть разделены на группы исходя из химических свойств боковых цепей соответствующих аминокислот. "Гидрофобными" аминокислотами являются Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. "Гидрофильными" аминокислотами являются Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эта группа аминокислот может быть также разделена на подклассы. "Незаряженными гидрофильными" аминокислотами являются Ser, Thr, Asn или Gln. "Кислотными" аминокислотами являются Glu или Asp. "Основными" аминокислотами являются Lys, Arg или His.

Используемый в настоящем описании термин "консервативная аминокислотная замена" представлена аминокислотными заменами внутри одной из следующих групп:

- (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- (2) фенилаланин, тирозин и триптофан;
- (3) серин и треонин;
- (4) аспарат и глутамат;
- (5) глутамин и аспарагин; и
- (6) лизин, аргинин и гистидин.

Используемый в настоящем описании термин "олигонуклеотид" означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметики. Этот термин также охватывает такие олигонуклеобазы, которые состоят из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (остов) связей, а также олигонуклеотидов, имеющих не встречающиеся в



природе модификации.

Используемый в настоящем описании термин "эпитоп" означает участок на белке (например, белке MASP-2), с которым связывается антитело. "Перепокрывающиеся эпитопы" включают по меньшей мере один (например, два, три, четыре, пять или шесть) общий аминокислотный остаток(и), включая линейные и нелинейные эпитопы.

Используемые в настоящем описании термины "полипептид", "пептид" и "белок" являются взаимозаменяемыми и означают любую связанную с пептидом цепь аминокислот независимо от длины или посттрансляционной модификации. Белок MASP-2, раскрытый в настоящем описании, может содержать или представлять собой белок дикого типа или может представлять собой вариант, который имеет не более 50 (например, не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50) консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены обычно включают замены в пределах одной из следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

В некоторых вариантах осуществления человеческий белок MASP-2 может иметь аминокислотную последовательность, которая является идентичной на 70% или более (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%) человеческому белку MASP-2, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

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

Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности определяется как процентное содержание аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотам в контрольной последовательности после выравнивания последовательностей и введения зазоров (гэпов), при необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены известными методами.

Используемый в настоящей заявке термин "примерно" или "приблизительно" перед числовым значением указывает на это значение плюс или минус 10% от указанного значения.

## II. Краткое описание изобретения.

Как раскрыто в настоящем описании, авторы изобретения определили центральную роль лектинового пути в инициации и прогрессировании заболевания тубулярной патологии почек, что подразумевает ключевую роль активации лектинового пути в патофизиологии широкого спектра почечных заболеваний, включая IgA-нефропатию, С3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты. В настоящем описании также указано, что авторы настоящего изобретения открыли, что ингибирование маннансвязывающей лектинассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2), ключевого регулятора лектинового пути системы комплемента, значительно уменьшает воспаление и фиброз в различных моделях животных фиброзного заболевания, включая модель односторонней обструкции мочеточника (UUO), модель передозировки белка и модель фиброза почек при индуцированной адриамицином нефропатии. Таким образом, авторы изобретения показали, что подавление MASP-2-опосредованной активации лектинового пути обеспечивает эффективный терапевтический подход для облегчения, лечения или профилактики фиброза почек, например тубулоинтерстициального фиброза, независимо от основной причины.

Лектины (MBL, М-фколин, Н-фколин, L-фколин и CL-11) являются специфическими молекулами распознавания, которые запускают систему комплемента по механизму реализации врожденного иммунитета, и такая система включает лектиновый путь инициации и связанную с ним петлю усиления терминального пути, которая усиливает иницированную лектином активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. C1q представляет собой специфическую молекулу распознавания, которая запускает систему комплемента по механизму реализации приобретенного иммунитета, и такая система включает классический путь инициации и ассоциированную с ним петлю усиления терминального пути, которая усиливает C1q-иницированную активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. Авторы ссылаются на эти две основные системы активации комплемента, такие как лектинзависимая

система комплемента и C1q-зависимая система комплемента, соответственно.

Дополнительно к своей важной роли в иммунной защите система комплемента вносит вклад в поражение тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует крайне необходимая потребность в разработке терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предупреждения развития этих побочных эффектов. Установление факта возможности подавления MASP-2-опосредуемого лектинового пути, при этом не затрагивая классический путь, обеспечивает возможность для крайне желательного специфического подавления активации только системы комплемента, вызывающей конкретную патологию, не подавляя полностью способность комплемента к иммунной защите. Так, например, при патологических состояниях, при которых активация комплемента опосредуется преимущественно лектинзависимой системой комплемента, предпочтительным является специфическое подавление только этой системы. Для регуляции процессинга иммунного комплекса и для обеспечения защиты хозяина от инфекции, система C1q-зависимой активации комплемента должна оставаться неизменной.

Предпочтительным белковым компонентом для мишени при разработке терапевтических агентов для специфического подавления лектинзависимой системы комплемента является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов лектинзависимой системы комплемента (MBL, Н-фиколина, М-фиколина, L-фиколина, MASP-2, C2-C9, фактор В, фактор D и пропердин), только MASP-2 является уникальным и необходимым для функционирования этой лектинзависимой системы комплемента. Лектины (MBL, Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и CL-11) также являются уникальными компонентами лектинзависимой системы комплемента. Однако потеря любого одного из этих лектиновых компонентов необязательно будет подавлять активацию этой системы, что обусловлено избыточным количеством лектина. Для гарантии подавления активации лектинзависимой системы комплемента необходимо ингибировать все пять лектинов. Кроме того, поскольку известно, что MBL и фиколины также обладают опсонинной активностью, не зависящей от комплемента, то подавление функции лектина будет приводить к потере этого ценного механизма защиты хозяина от инфекции. В противоположность этому, такая не зависящая от комплемента опсонинная активность лектина останется нетронутой, если мишенью для ингибирования является MASP-2. Другое преимущество MASP-2 в качестве терапевтической мишени для подавления активации лектинзависимой системы комплемента заключается в том, что концентрация MASP-2 в плазме, по сравнению с любыми другими белками комплемента, является самой низкой (~500 нг/мл), и поэтому для полного подавления будут достаточными низкие концентрации высокоаффинных ингибиторов MASP-2 (Moller-Kristensen, M. et al., J. Immunol. Methods, 282:159-167, 2003).

Как описано в примере 14 настоящего описания, на животной модели фиброзной болезни почек (односторонняя обструкция мочеточника UUO) было определено, что заболевание почек у мышей, лишенных гена MASP-2 (MASP-2<sup>-/-</sup>), проявилось в значительно меньшей степени по сравнению с контрольными животными дикого типа, о чем свидетельствовали воспалительные клеточные инфильтраты (снижение на 75%) и гистологические маркеры фиброза, такие как отложение коллагена (уменьшение на одну треть). В примере 15 дополнительно показано, что мыши дикого типа, которым системно вводили моноклональное анти-MASP-2 антитело, избирательно блокирующее лектиновый путь, оставляя нетронутым классический путь, были защищены от фиброза почек по сравнению с мышами дикого типа, которым вводили антитело изотипного контроля. Эти результаты свидетельствуют о том, что лектиновый путь является ключевым фактором, вызывающим заболевание почек, и еще раз демонстрируют, что блокирующий лектиновый путь ингибитор MASP-2, такой как анти-MASP-2 антитело, является эффективным в качестве антифиброзного агента. В примере 16 на модели передозировки белка дополнительно показано, что у мышей дикого типа, которые получали бычий сывороточный альбумин (BSA), развилась протеинурическая нефропатия, тогда как у MASP-2<sup>-/-</sup>-мышей, получавших такую же дозу BSA, повреждение почек проявилось в меньшей степени. В примере 17 показано, что мыши дикого типа, которым системно вводили моноклональное анти-MASP-2 антитело, избирательно блокирующее лектиновый путь, оставляя нетронутым классический путь, были защищены от повреждения почек в модели передозировки белка. В примере 18 показано, что у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей наблюдалось воспаление почек и тубуло-интерстициальное повреждение в индуцированной адриамицином нефрологической модели фиброза почек в меньшей степени по сравнению с мышами дикого типа. В примере 19 показано, что в проводимой в настоящий момент фазе 2 открытого клинического исследования почечных заболеваний пациенты с IgA-нефропатией, которым вводили анти-MASP-2 антитело, к концу лечения имели клинически значимое и статистически достоверное уменьшение соотношения альбумин/креатинин в моче (uACR) на протяжении всего исследования, а также уменьшение уровня белка в моче, собираемой в течение 24 ч, по сравнению с исходным уровнем. В примере 19 также показано, что в том же исследовании фазы 2 у пациентов с мембранозной нефропатией, которым вводили анти-MASP-2 антитело, также наблюдалось снижение uACR во время лечения. В примере 20 показано, что в проводимой в настоящее время фазе 2 открытого исследования почек в конце лечения у 4 из 5 пациентов с волчаночным нефритом (BN), которых лечили анти-MASP-2 антителом, наблюдали клинически значимое уменьшение уровня белка в 24-часовом сборе мочи относительно исходного уровня.

В соответствии с вышесказанным настоящее изобретение относится к применению ингибирующих

MASP-2 агентов, таких как ингибирующие MASP-2 антитела, в качестве антифиброзных агентов, к применению ингибирующих MASP-2 агентов для изготовления лекарственного средства для лечения фиброзного состояния и к способам профилактики, лечения, облегчения или купирования фиброзного состояния у нуждающегося в этом человека, где указанный способ включает введение указанному пациенту эффективного количества ингибирующего MASP-2 агента (например, анти-MASP-2 антитела).

Способы по изобретению могут быть использованы для профилактики, лечения, облегчения или купирования фиброзного состояния у человека, страдающего любым заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включая заболевания почек (например, хроническое заболевание почек, IgA-нефropатию, СЗ-гломерулопатию и другие гломерулонефриты), легких (например, идиопатический фиброз легких, кистозный фиброз, бронхоэктаз), печени (например, цирроз, неалкогольная жировая болезнь печени), сердца (например, инфаркт миокарда, фиброз предсердий, фиброз клапанов, фиброз эндомикарда), мозга (например, инсульт), кожи (например, чрезмерное заживление ран, склеродермия, системный склероз, келоиды), сосудистой системы (например, атеросклеротическое сосудистое заболевание), кишечника (например, болезнь Крона), глаз (например, передняя субкапсулярная катаракта, помутнение задней капсулы), структур мягких тканей скелетно-мышечной системы (например, клеточный капсулит, контрактура Дюпюитрена, миелофиброз), репродуктивных органов (например, эндометриоз, болезнь Пейрони) и некоторых инфекционных заболеваний (например, альфа-вирус, гепатит С и гепатит В).

### III. Роль MASP-2 при заболеваниях и состояниях, вызванных или осложненных фиброзом.

Фиброз представляет собой образование или наличие избыточного количества соединительной ткани в органе или ткани, образуемое, как правило, в ответ на повреждение или поражение. Отличительным признаком фиброза является продуцирование избыточного внеклеточного матрикса после поражения. В почках фиброз характеризуется как прогрессирующее пагубное отложение соединительной ткани на паренхиме почки, что неизбежно приводит к снижению функции почек независимо от первичного заболевания почек, которое вызывает их первоначальное повреждение. Так называемый эпителиально-мезенхимный переход (EMT), изменение клеточных характеристик, при котором канальцевые эпителиальные клетки трансформируются в мезенхимальные фибробласты, составляет основной механизм фиброза почек. Фиброз поражает почти все ткани и системы органов и может возникать как ответная реакция в виде восстановления или замещения на стимул, такой как повреждение ткани или воспаление. Нормальный физиологический ответ на повреждение приводит к накоплению соединительной ткани, но если этот процесс становится патологическим, замена высокодифференцированных клеток путем рубцевания соединительной ткани изменяет структуру и функцию ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты размножаются и дифференцируются в миофибробласты, приводя к сокращению матрикса, увеличению ригидности, микроваскулярной компрессии и гипоксии. В настоящее время отсутствует эффективное лечение или терапия фиброза, но и отчеты исследований на животных, и эпизодические отчеты по лечению людей говорят о том, что фиброзные поражения тканей могут быть купированы (Tampere and Zeisberg, *Nat. Rev. Nephrol.*, vol 10:226-237, 2014).

Многие заболевания являются результатом фиброза, который вызывает прогрессирование органной недостаточности, включая заболевания почек (например, хроническое заболевание почек, IgA-нефropатию, СЗ-гломерулопатию и другие гломерулонефриты), легких (например, идиопатический фиброз легких, кистозный фиброз, бронхоэктаз), печени (например, цирроз, неалкогольная жировая болезнь печени), сердца (например, инфаркт миокарда, фиброз предсердий, фиброз клапанов, фиброз эндомикарда), мозга (например, инсульт), кожи (например, чрезмерное заживление ран, склеродермия, системный склероз, келоиды), сосудистой системы (например, атеросклеротическое сосудистое заболевание), кишечника (например, болезнь Крона), глаз (например, передняя субкапсулярная катаракта, помутнение задней капсулы), структур мягких тканей скелетно-мышечной системы (например, клеточный капсулит, контрактура Дюпюитрена, миелофиброз), репродуктивных органов (например, эндометриоз, болезнь Пейрони) и некоторых инфекционных заболеваний (например, альфа-вирус, гепатит С и гепатит В и т.д.).

Хотя фиброз возникает во многих тканях и при многих заболеваниях, в его патологии существуют общие молекулярные и клеточные механизмы. Отложение внеклеточного матрикса фибробластами сопровождается инфильтрацией иммунных клеток, преимущественно мононуклеарных клеток (см. Wynn T., *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8):583-594, 2004, включенный в настоящее описание в виде ссылки). Активный воспалительный ответ приводит к экспрессии факторов роста (TGF-бета, VEGF, фактора роста гепатоцитов, фактора роста соединительной ткани), цитокинов и гормонов (эндотелина, IL-4, IL-6, IL-13, хемокинов), ферментов деструкции (эластазы, матриксных металлопротеиназ, катепсинов) и белков внеклеточного матрикса (коллагенов, фибронектина, интегринов).

Кроме того, система комплемента становится активной при многочисленных фиброзных заболеваниях. Компоненты комплемента, включая мембраноатакующий комплекс, были идентифицированы в многочисленных образцах фиброзной ткани. Например, компоненты лектинового пути были обнаружены при фиброзных поражениях почек (Satomura et al., *Nephron.*, 92 (3):702-4 (2002), Sato et al., *Lupus*, 20(13):1378-86 (2011); Liu et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 174 (1):152-60 (2013)); заболеваниях печени (Rensen et al., *Hepatology*, 50(6):1809-17 (2009)); и болезни легких (Olesen et al., *Clin. Immunol.*, 121(3):324-31 (2006)).

Было установлено, что чрезмерная активация системы комплемента является одним из ключевых факторов развития опосредованного иммунным комплексом, а также антителонезависимого, гломеруло-нефрита. Тем не менее существуют убедительные свидетельства того, что неконтролируемая активация комплемента *in situ* связана с патофизиологическим прогрессированием Т1 фиброза при негломерулярном заболевании (Quigg R.J., *J. Immunol.*, 171:3319-3324, 2003; Naik A. et al., *Semin. Nephrol.*, 33:575-585, 2013; Mathern D.R. et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 10:P1636-1650, 2015). Сильные провоспалительные сигналы, вызванные локальной активацией комплемента, могут быть инициированы компонентами комплемента, попадающими путем фильтрации в проксимальные каналцы и впоследствии в интерстициальное пространство, или аномальным синтезом компонентов комплемента каналцевыми или другими резидентными и инфильтрирующими клетками, или измененной экспрессией регуляторных белков комплемента в клетках почек, или отсутствием или потерей, или увеличением функциональных мутаций в регуляторных компонентах комплемента (Mathern D.R. et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 10:P1636-1650, 2015; Sheerin N.S. et al., *FASEB J.*, 22:1065-1072, 2008). Например, у мышей дефицит регуляторного белка/гена (Ctgy), связанного с регуляторным белком комплемента CR1, приводит к активации комплемента по типу тубулоинтерстициального (Т1) повреждения с последующим воспалением и фиброзом, характерным для повреждения, наблюдаемого при Т1 заболеваниях человека (Naik A. et al., *Semin. Nephrol.*, 33:575-585, 2013; Bao L. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18:811-822, 2007). Воздействие каналцевых эпителиальных клеток на анафилатоксин C3a приводит к эпителиально-мезенхимному переходу (Tsang Z. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20:593-603, 2009). Недавно было показано, что блокирование передачи сигнала C3a только через C3a-рецептор уменьшает Т1 фиброз почек у животных с протеинурическими и непротеинурическими заболеваниями (Tsang Z. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20:593-603, 2009; Bao L. et al., *Kidney Int.*, 80:524-534, 2011).

Как раскрыто в настоящем описании, авторы изобретения определили центральную роль лектинового пути в инициации и прогрессировании тубулярной патологии почек, что подразумевает ключевую роль активации лектинового пути в патофизиологии широкого спектра заболеваний почек, включая IgA-нефропатию, C3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты (Endo M. et al., *Nephrol. Dialysis Transplant.*, 13:1984-1990, 1998; Hisano S. et al., *Am. J. Kidney. Dis.*, 45:295-302, 2005; Roos A. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17:1724-1734, 2006; Liu L.L. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 174:152-160, 2013; Lhotta K. et al., *Transplant. Nephrol. Disysis.*, 14:881-886, 1999; Pickering et al., *Kidney International*, 84:1079-1089, 2013), диабетическую нефропатию (Hovind P. et al., *Diabetes*, 54:1523-1527, 2005), ишемическое реперфузионное поражение (Asgari E. et al., *FASEB J.*, 28:3996-4003, 2014) и отторжение трансплантата (Berger S.P. et al., *Am. J. Transplant.*, 5:1361-1366, 2005).

Как дополнительно показано в настоящем описании, авторы изобретения продемонстрировали, что подавление MASP-2 уменьшает воспаление и фиброз в мышинных моделях тубулоинтерстициального заболевания. Поэтому предполагается, что ингибирующие MASP-2 агенты будут полезны при лечении фиброза почек, включая тубулоинтерстициальное воспаление и фиброз, протеинурию, IgA-нефропатию, C3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты и ишемические реперфузионные поражения почек.

Почечные заболевания и расстройства.

По данным Национального почечного фонда 26 млн взрослых американцев страдают хроническим заболеванием почек (ХЗП). Большинство пациентов имеют прогрессирующее заболевание, приводящее к почечной недостаточности, требующей лечения препаратами, стимулирующими эритропоэз, диализа или трансплантации почки для выживания. Существует несколько препаратов, которые могут лечить основной симптом ХЗП, гипертонию, но в настоящее время нет лекарств, которые устраняют его первопричину.

Исследования показали, что прогрессирующее повреждение почек вызвано капиллярной гипертензией в подструктурах почки, известных как нефроны (Whitworth J.A., *Annals. Acad. of Med.*, vol. 34(1):2005). Поскольку нефроны (фильтрующие единицы почек) повреждаются или разрушаются в этом процессе, возникает воспаление и происходит рубцевание ткани, что приводит к замене нефронов нефункциональной рубцовой тканью. В результате способность почки фильтровать кровь снижается с течением времени. Это называется фиброзом почек, который является общим процессом прогрессирующего заболевания почек. Независимо от характера первоначального поражения фиброз почек считается общим конечным процессом, по которому заболевание почек прогрессирует до терминальной стадии почечной недостаточности.

Ослабление фиброза почек можно определить по одному или более из следующих параметров: оценки интерстициального объема, отложению коллагена IV и/или уровням мРНК, содержащей гены, контролирующие рост соединительной ткани. Соединения и способы, описанные в настоящей заявке, полезны в лечении фиброза почек.

Фиброз и воспаление почек являются характерными признаками поздней стадии заболевания почек практически любой этиологии (см. Boog P. et al., *J. of Am Soc. Nephrology.*, 18:1508-1515, 2007; и Chevalier et al., *Kidney International*, 75:1145-1152, 2009). Почечная недостаточность может быть вызвана гетерогенной группой расстройств. Прогрессивная дисфункция почек приводит к протеинурии и почечной недостаточности. Поскольку состояние здоровья пациента ухудшается, может потребоваться диализ просто для предотвращения повреждения почек и предупреждения многосистемной недостаточности. Со

временем поражение почек и почечная недостаточность могут прогрессировать до терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН), которая является полной или почти полной, безвозвратной потерей функции почек. В зависимости от формы заболевания почек функция почек может быть потеряна в течение нескольких дней или недель или может медленно и постепенно ухудшаться в течение десятилетий. После того как заболевание пациента прогрессировало до ТСПН, для предотвращения смерти пациента требуется диализ (гемодиализ или перитонеальный диализ). Пациентов необходимо поддерживать в некоторой форме диализного режима или предоставить почечный трансплантат.

Компоненты лектинового пути были обнаружены при фиброзных поражениях при почечных заболеваниях (Satomura et al., *Nephron*, 92(3):702-4 (2002); Sato et al., *Lupus*, 20(13):1378-86 (2011)); Liu et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 174(1):152-60 (2013)). При IgA-нефропатии у пациентов с гломерулярным отложением MBL наблюдалась более выраженная протеинурия, сниженная функция почек, более низкие уровни сывороточного альбумина, более тяжелая гистология и повышенная артериальное давление по сравнению с пациентами без отложения MBL (Liu et al., *Clin. Exp. Immunol.*, (1):152-60). У пациентов с волчаночным нефритом (Sato et al., *Lupus*, 20(13):1378-86, 2011) и хронической почечной недостаточностью (Satomura et al., *Nephron*, 92(3):702-4, 2002) также наблюдали повышенные уровни MBL и активность лектинового пути.

Было также продемонстрировано, что дефицит C5 приводит к значительному ослаблению основных компонентов фиброза почек в непротеинурической модели первичного тубулоинтерстициального поражения, а именно односторонней обструкции мочеточника (UUO) (Boor P. et al., *J. of Am. Soc. of Nephrology*, 18:1508-1515, 2007). Также имеются сообщения об увеличенной экспрессии гена C3 у мышей дикого типа после UUO и значительном уменьшении отложений коллагена у C3-/- мышей после UUO по сравнению с мышами дикого типа, что указывает на роль активации комплемента при фиброзе почек (Fearn et al., *Mol. Immunol.*, 48:1666-1733, 2011, abstract). Однако до описанного в настоящей заявке открытия авторами настоящего изобретения компоненты комплемента, участвующие в фиброзе почек, не были четко определены. Как описано в примерах 14-17 настоящей заявки, авторы настоящего изобретения неожиданно определили, что дефицит MASP-2 или блокада ингибирующим MASP-2 антителом, которое избирательно блокирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь, явно обеспечивает защиту мышей от фиброза почек на различных животных моделях заболевания почек.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представляется способ подавления фиброза почек у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством почек, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение ингибирующего MASP-2 агента, такого как анти-MASP-2 антитело, нуждающемуся в этом субъекту. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза почек у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством почек, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем локального нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционно, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля над этим состоянием.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или состояния почек. В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) вводят в комбинации с режимом диализа или плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) используются для уменьшения частоты необходимого диализа или плазмафереза. В некоторых других вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) используются в комбинации с трансплантацией почки. В некоторых других вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) используются для осуществления контроля над почечной недостаточностью и предотвращения дальнейшего ухудшения функции почек у пациентов, ожидающих трансплантации почек.

В качестве примера в некоторых вариантах осуществления анти-MASP-2 антитела используются для подавления фиброза почек и, таким образом, лечения или облегчения (включая лечение или облегчение симптомов заболевания) гломерулярных заболеваний, таких как фокальный сегментарный гломерулосклероз и нефротический синдром. Примерами симптомов, которые можно лечить, являются, помимо прочего, гипертензия, протеинурия, гиперлипидемия, гематурия и гиперхолестеринемия. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий MASP-2 агент подавляет тубулоинтерстициальный фиброз. В некоторых вариантах осуществления лечение включает улучшение функции почек, уменьшение протеинурии, улучшение состояния при гипертензии и/или уменьшение фиброза почек. В некоторых вариантах осуществления лечение включает

- (i) задержку или профилактику прогрессирования почечной недостаточности, угасания функции почек или развития ТСПН;
- (ii) задержку, уменьшение частоты или устранение необходимости в диализе; или
- (iii) задержку или устранение необходимости в трансплантации почек.

Ниже описаны некоторые специфические заболевания и расстройства почек, вызванные или осложненные фиброзом и/или воспалением.

В некоторых вариантах осуществления заболевание почек, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, представляет собой гломерулярное заболевание, такое как фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS). Гломерулярные заболевания поражают клубочки, позволяя белкам, а иногда и красным кровяным клеткам, проникать в мочу. Иногда гломерулярное заболевание также препятствует почкам осуществлять очистку от продуктов жизнедеятельности, поэтому они начинают накапливаться в крови. Симптомы гломерулярного заболевания включают протеинурию, гематурию, снижение скорости клубочковой фильтрации, гипопроteinемию и отеки. Несколько различных заболеваний могут привести к развитию гломерулярного заболевания. Это может быть прямым результатом инфекции или приема лекарств, токсичных для почек, или результатом заболевания, которое поражает весь организм, такого как, гипертония, диабет или волчанка. ТСПН является одним из гломерулярных заболеваний, но даже это особое состояние, характеризующееся рубцеванием в почках, может иметь множество причин. У пациентов с ТСПН, как правило, терминальная стадия почечной недостаточности достигается в течение 5-20 лет, хотя пациенты с агрессивными формами заболевания достигают ТСПН через 2-3 г.

В некоторых вариантах осуществления заболевание почек, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, представляет собой диабетическую нефропатию (ДН), которая относится к области медицины, требующей незамедлительных решений. Диабетическая нефропатия - это заболевание почек или нарушение функции почек, которое осложнено диабетом. Состояние усугубляется высоким кровяным давлением, высоким уровнем сахара в крови и высоким уровнем холестерина и липидов. Точная причина диабетической нефропатии неизвестна. Однако, не ограничиваясь конкретной теорией, предполагается, что неконтролируемый высокий уровень сахара в крови приводит к поражению почек, такому как фиброз и рубцевание ткани. У людей ДН проявляется в виде клинического синдрома, который состоит из альбуминурии, постепенно снижающейся скорости клубочковой фильтрации (GFR) и повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний. Диабетическая альбуминурия связана с развитием характерных гистопатологических признаков, включая утолщения клубочковой базальной мембраны (КБМ) и экспансию мезангиального матрикса. По мере развития альбуминурии и почечной недостаточности развиваются гломерулосклероз, артериоральный гиалиноз и тубулоинтерстициальный фиброз.

Соответственно в одном из вариантов осуществления в настоящем раскрытии предоставляются способы лечения диабетической нефропатии, включающие введение эффективного количества ингибирующего MASP-2 агента (например, ингибирующего MASP-2 антитела) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение одного или более симптомов диабетической нефропатии. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение, замедление или устранение необходимости в диализе. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение, замедление или устранение необходимости в трансплантации почек. В некоторых вариантах осуществления лечение включает задержку, профилактику или купирование прогрессирования диабетической нефропатии до угасания функции почек или терминальной стадии почечной недостаточности.

В некоторых вариантах осуществления заболевание почек, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, представляет собой волчаночный нефрит. Согласно подробному описанию, приведенному ниже, волчаночный нефрит, который является серьезным осложнением системной красной волчанки (СКВ), является еще одним примером фиброза почек, который можно лечить ингибирующими MASP-2 агентами (например, анти-MASP-2 антителами).

Соответственно в одном из вариантов осуществления настоящее раскрытие содержит способы подавления фиброза почек у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством почек, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающие введение эффективного количества ингибирующего MASP-2 агента (например, ингибирующего MASP-2 антитела). В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство почек, осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности, гломерулярного заболевания (например, фокального сегментарного гломерулосклероза), иммунного комплексного расстройства (например, IgA-нефрита, мембранозной нефропатии), волчаночного нефрита, нефротического синдрома, диабетической нефропатии, тубулоинтерстициального поражения и С3-гломерулопатии или других типов гломерулонефрита.

Способы профилактики или лечения повреждения почек, вызванного лекарственно-индуцированной токсичностью.

Другая причина повреждения почек включает лекарственно-индуцированную токсичность. Например, нефротоксины могут оказывать непосредственное токсическое действие на канальцевые эпителиальные клетки. Как раскрыто в настоящем описании, авторы изобретения продемонстрировали, что мы-

ши с дефицитом MASP-2 защищены от индуцированной адриамицином нефропатии.

Нефротоксины включают без ограничения терапевтические лекарственные вещества (например, цисплатин, гентамицин, цефалоридин, циклоспорин, амфотерицин, адриамицин), радиоcontrastный краситель, пестициды (например, паракват) и вещества, загрязняющие окружающую среду (например, трихлорэтилен и дихлорацетилен). Другие примеры включают пурамицин-аминонуклеозид (PAN); аминогликозиды, такие как гентамицин; цефалоспорины, такие как цефалоридин; ингибиторы кальциневрина, такие как такролимус или сиролимус. Лекарственно-индуцированная нефротоксичность также может быть вызвана нестероидными противовоспалительными средствами, антиретровирусными препаратами, антицитокинами, иммунодепрессантами, онкологическими препаратами или ингибиторами АПФ. Кроме того, лекарственно-индуцированная нефротоксичность может быть вызвана злоупотреблением нальгезином, ципрофлоксацином, клопидогрелем, кокаином, ингибиторами сох-2, диуретиками, фоскаметом, золотом, ифосфамидом, иммуноглобином, китайскими травами, интерфероном, литием, маннитолом, мезаламином, митомидином, нитрозомочевинной, пеницилламином, пенициллином, пентамидином, хинином, рифампином, стрептозоцином, сульфонидами, тиклопидином, триамтереном, вальпроевой кислотой, доксорубицином, глицерином, цидофовиrom, тобрамицином, неомицинсульфатом, колистиметатом, ванкомицином, амикацином, цефотаксимом, цисплатином, ацикловиром, литием, интерлейкином-2, циклоспорином или индинавиром.

Соответственно в одном из вариантов осуществления субъект, подверженный риску развития или страдающий повреждением почек, может получать один или более терапевтических препаратов, которые оказывают нефротоксическое действие. Этим субъектам можно вводить ингибиторы MASP-2 по изобретению до или одновременно с такими терапевтическими агентами. Аналогично ингибиторы MASP-2 можно вводить после введения терапевтического агента для лечения или снижения вероятности развития нефротоксичности.

Заболевания и состояния, ассоциированные с протеинурией.

Установлено, что нарушение клубочковой фильтрации белка приводит к протеинурии и ускоряет прогрессирующую потерю нефронов, которая происходит при всех хронических почечных заболеваниях (Remuzzi and Bertani, *New Eng. J. Med.*, vol. 339(20):1448-1456, 1998). Например, в исследовании, описанном Eddy et al., *Am. J. Pathol.*, 135:719-33, 1989, гломерулярная фильтрация альбумина неизменно сопровождалась развитием интерстициальных поражений и рубцеванием. Eddy et al., 1989, также отметил, что отложение комплемента C3 на люминальной поверхности проксимальных канальцев наблюдалось у крыс с нефропатией, вызванной передозировкой белка, что указывает на то, что компоненты системы комплемента, фильтруемые в гломерулах, могут вызывать интерстициальные повреждения. Было продемонстрировано, что истощение комплемента или отсутствие C6 облегчало тубулоинтерстициальное повреждение в протеинурических моделях животных, таких как мезангиопролиферативный гломерулонефрит, адриамициновая нефропатия, 5/6 нефрэктомия и пурамицин-аминонуклеозидный нефроз (Boor et al., *J. of Am. Soc. of Nephrol.*, JASN, 18:1508-1515, 2007). Исследования на людях показали, что протеинурия является независимым прогностическим фактором прогрессирования хронического заболевания почек и что уменьшение протеинурии является почечно-защитным (Ruggenenti P. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 23:1917-1928, 2012).

Соответственно в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам профилактики или уменьшения протеинурии и/или профилактики или уменьшения поражения почек у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с протеинурией, включающим введение количества ингибирующего MASP-2 агента (например, ингибирующего MASP-2 антитела), эффективного для уменьшения или профилактики протеинурии у субъекта. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией выбирают из группы, состоящей из нефротического синдрома, преэклампсии, эклампсии, токсического поражения почек, амилоидоза, сосудисто-коллагенозных заболеваний (например, системной красной волчанки), обезвоживания, гломерулярных заболеваний (например, мембранозного гломерулонефрита, фокального сегментарного гломерулонефрита, C3-гломерулопатии, болезни минимальных изменений, липоидного нефроза), интенсивной физической нагрузки, стресса, доброкачественной ортостатической (постуральной) протеинурии, фокального сегментарного гломерулосклероза, IgA-нефропатии (например, болезни Бергера), IgM-нефропатии, мембранопротеративного гломерулонефрита, мембранозной нефропатии, болезни минимальных изменений, саркоидоза, синдрома Альпорта, сахарного диабета (диабетической нефропатии), лекарственно-индуцированной токсичности (например, индуцированной НПВП, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами, ингибиторами АПФ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином)); болезни Фабри, инфекции (например, ВИЧ, сифилиса, гепатита А, В или С, постстрептококковой инфекции, мочевого шистосомоза); аминоацидурий, синдрома Фанкони, гипертонического нефросклероза, интерстициального нефрита, серповидноклеточной болезни, гемоглобинурии, множественной миеломы, миоглобинурии, отторжения органов (например, отторжения трансплантата почки), геморрагической лихорадки эбола, синдрома ногтевой пателлы, семейной лихорадки, синдрома HELLP, системной красной волчанки, гранулематоза Вегенера, ревматоидного артрита, болезни накопления гликогена типа 1, синдрома Гудпасчера, пурпury Шенляйна-

Геноха, инфекции мочевых путей, распространившейся на почки, синдрома Шегрена и постинфекционного гломерулонефрита.

Заболевание печени.

Фиброз печени, также называемый печеночным фиброзом, обусловлен накоплением рубцовой ткани в печени и является характерным для большинства видов заболеваний печени. Замена здоровой ткани печени рубцовой тканью снижает способность печени функционировать должным образом. Если состояние, вызывающее рубцевание, не лечится, фиброз печени может прогрессировать до цирроза печени и полной печеночной недостаточности, опасного для жизни состояния. Основными причинами фиброза печени являются злоупотребление алкоголем, хроническая инфекция вируса гепатита С, безалкогольный стеатогепатит и гепатотоксичность (например, лекарственно-индуцированное повреждение печени, вызванное ацетаминофеном или другим лекарственным средством).

Компоненты лектинового пути были обнаружены при фиброзных поражениях печени (Rensen et al., *Hepatology*, 50(6):1809-17 (2009)). Например, при безалкогольном стеатогепатите (также известном как жировое заболевание печени) широко распространена активация белков системы комплемента и их экспрессия связана с тяжестью заболевания (Rensen et al., *Hepatology*, 50(6):1809-17 (2009)), причем, помимо отложений C3 и C9, было обнаружено накопление MBL, что подтверждает активацию лектинового пути.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представляется способ подавления печеночного фиброза у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством печени, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующего MASP-2 антитела. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления печеночного фиброза у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством печени, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неопиоидных средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или состояния печени.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство печени, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из цирроза, неалкогольной жировой болезни печени (стеатогепатита), фиброза печени, вторичного по отношению к злоупотреблению алкоголем, фиброза печени, вторичного по отношению к острому или хроническому гепатиту, билиарного заболевания и токсического поражения печени (например, гепатотоксичности в результате лекарственно-индуцированного повреждения печени, вызванного ацетаминофеном или другим лекарственным средством).

Заболевание легких.

Легочный фиброз - это образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в легких, при этом нормальная легочная ткань заменяется фиброзной тканью. Это рубцевание приводит к ригидности легких и нарушению структуры и функции легких. Считается, что у людей фиброз легких является результатом многократного повреждения ткани внутри крошечных воздушных мешочков (альвеол) в легких и между ними. В экспериментальных исследованиях аспекты заболевания человека были воссозданы на различных моделях животных. Например, инородный агент, такой как блеомицин, изотиоцианат флуоресцеина, оксид кремния или асбест, может быть введен в трахею животного (Gharaee-Kermani et al., *Animal. Models. of Pulmonary Fibrosis. Methods Mol. Med.*, 2005, 117:251-259).

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представляется способ подавления легочного фиброза у субъекта, страдающего легочным заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления легочного фиброза, уменьшения фиброза в легких и/или улучшения функции легких. Улучшение симптомов функции легких включает улучшение функции и/или емкости легких, снижение усталости и улучшение насыщения кислородом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, подавления, профилактики или облегчения легочного фиброза у субъекта, страдающего кистозным фиброзом, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, пу-



тем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения или в случае непереносимости средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или состояния легких.

Ниже описаны некоторые специфические легочные заболевания и расстройства, вызванные или осложненные фиброзом и/или воспалением.

В некоторых вариантах осуществления заболевание легких, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, представляет собой хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ). ХОБЛ - это заболевание, при котором стенки дыхательных путей являются фиброзными с накоплением миофибробластов и коллагена, и является основной причиной инвалидности, и четвертой ведущей причиной смертности в Соединенных Штатах. При ХОБЛ блокируется воздушный поток, и затрудняется дыхание больного. ХОБЛ вызывается повреждением дыхательных путей, которое в конечном итоге препятствует обмену кислорода и углекислого газа в легких. ХОБЛ включает хронический обструктивный бронхит и эмфизему и часто и то, и другое. Пациенты с ХОБЛ, чьи легкие уже повреждены, и функция легких уже нарушена, подвержены повышенному риску осложнений, связанных с бактериальными и вирусными инфекциями.

Соответственно в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), включающим введение нуждающемуся в этом субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента (например, анти-MASP-2 антитела), эффективного для подавления и/или уменьшения фиброза легкого. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение одного или нескольких симптомов ХОБЛ. Симптомы ХОБЛ и/или фиброза легких включают без ограничения кашель со слизью, одышку (диспнею), которая может ухудшаться при умеренной активности, усталость, частые респираторные инфекции, хрип, сдавленность в груди, нерегулярные сердечные сокращения (аритмию), потребность в дыхательном аппарате и кислородной терапии, правостороннюю сердечную недостаточность или пульмонию (отек сердца и сердечную недостаточность из-за хронического заболевания легких), пневмонию, пневмоторакс, серьезную потерю массы тела и неадекватное питание. Симптомы также включают снижение функции легких, согласно оценкам, полученным в результате тестирования с использованием одного или более стандартных тестов функции легких.

В некоторых вариантах осуществления болезнь легких, вызванная или осложненная фиброзом и/или воспалением, представляет собой фиброз легких, ассоциированный со склеродермией. Как более подробно описано ниже, легочный фиброз, ассоциированный со склеродермией, является еще одним примером фиброза легких, который можно лечить ингибиторами MASP-2 (например, ингибирующими MASP-2 антителами).

В некоторых вариантах осуществления заболевание легких или нарушение функции легких, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, фиброза легких, ассоциированного со склеродермией, бронхоэктаза и легочной гипертензии.

Сердечно-сосудистые заболевания.

Причиной ряда различных сердечно-сосудистых патологий является общий фиброзный процесс. Чрезмерное отложение фиброзной ткани в сердце приводит к сердечной патологии, при которой продуцирование белков внеклеточного матрикса изменяет структуру, архитектуру, форму сердца и влияет на его сократительную функцию (Khan and Sheppard, *Immunology*, 118:10-24, 2006).

Исследования показывают, что фиброз может в значительной степени способствовать сердечной дисфункции при ишемической, дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии. Например, было показано, что у пациентов с хронической фибрилляцией предсердий были обнаружены более высокие уровни интерстициального фиброза миокарда по сравнению с контролем (Khan and Sheppard, *Immunology*, 118:10-24, 2006). В качестве другого примера было установлено, что в большинстве случаев аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ) в США наблюдается инфильтрация жира и рубцевание (фиброжировая АКПЖ) (Burke et al., *Circulation*, 97:1571-1580, 1998). В исследовании, в котором изучали гистопатологические характеристики миокарда желудочков у людей с АКПЖ, было установлено, что обширный фиброз присутствовал в образцах биопсии у пациентов детского возраста с АКПЖ (Nishikawa T. et al., *Cardiovascular Pathology*, vol. 8(4):185-189, 1999).

Соответственно в некоторых вариантах осуществления предоставляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего сердечным или сосудистым заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2

агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления сердечного и/или сосудистого фиброза и/или улучшения сердечной и/или сосудистой функции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, подавления, профилактики или ослабления фиброза у субъекта, страдающего фиброзом клапана, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного сердечного или сосудистого заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления сердечное или сосудистое заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из сердечного фиброза, инфаркта миокарда, фиброза предсердий, фиброза эндомикарда, аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ), сосудистого заболевания, атеросклеротического сосудистого заболевания, сосудистого стеноза, рестеноза, васкулита, флебита, тромбоза глубоких вен и аневризмы брюшной аорты.

Хронические инфекционные заболевания.

Хронические инфекционные заболевания, такие как гепатит С и гепатит В, вызывают воспаление тканей и фиброз, а высокая активность лектинового пути может быть вредной. При таких заболеваниях ингибиторы MASP-2 могут быть полезными. Например, было обнаружено, что уровни MBL и MASP-1 являются важными прогностическими параметрами тяжести фиброза печени при инфекции вируса гепатита С (Brown et al., Clin. Exp. Immunol., 147(1):90-8, 2007; Saadanay et al., Arab. J. Gastroenterol., 12(2):68-73, 2011; Saeed et al., Clin. Exp. Immunol., 174(2):265-73, 2013). Ранее было показано, что MASP-1 является мощным активатором MASP-2 и лектинового пути (Megyeri et al., J. Biol. Chem., 29:288(13):8922-34, 2013). Альфа-вирусы, такие как вирус чикунгунья и вирус Росс-Ривер, вызывают сильный воспалительный ответ у хозяина, приводящий к артриту и миозиту, и эта патология опосредуется MBL и активацией лектинового пути (Gunn et al., PLoS Pathog., 8(3):e1002586, 2012).

Соответственно в некоторых вариантах осуществления раскрытие представляет способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего или ранее перенесшего хроническое инфекционное заболевание, которое вызывает воспаление и/или фиброз, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного хронического инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления хроническое инфекционное заболевание, которое вызывает воспаление и/или фиброз, выбирают из группы, состоящей из альфа-вируса, гепатита А, гепатита В, гепатита С, туберкулеза, ВИЧ и гриппа.

Аутоиммунные заболевания.

Склеродермия - хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся фиброзом, сосудистыми изменениями и аутоантителами. Существуют две основные формы: ограниченная системная склеродермия и диффузная системная склеродермия. Кожные симптомы ограниченной системной склеродермии поражают руки, плечи и лицо. Пациенты с этой формой склеродермии часто имеют одно или несколько из следующих осложнений: кальциноз, феномен Рейно, дисфункцию пищевода, склеродактил и телеангиэктазии. Диффузная системная склеродермия быстро прогрессирует и затрагивает большую область кожи и один или более внутренних органов, часто почки, пищевод, сердце и/или легкие.

Склеродермия поражает небольшие кровеносные сосуды, известные как артериолы, во всех органах. Сначала эндотелиальные клетки артериол погибают в результате апоптоза вместе с гладкомышеч-

ными клетками. Эти клетки заменяются коллагеном и другим волокнистым материалом. Воспалительные клетки, в частности CD4+ хелперные Т-клетки, проникают в артериолу и вызывают дальнейшее повреждение.

Кожные проявления склеродермии могут быть болезненными, приводить к избеганию использования пораженного участка (например, рук, пальцев рук, пальцев ног, ног и т.д.) и могут приводить к обезображиванию таких участков. На коже могут появиться язвы, и такие язвы могут быть подвержены инфекции или даже гангрене. Изъязвленная кожа может быть трудноизлечимой или медленно поддаваться излечению. Трудность при заживлении язв кожи может быть особенно осложнена у пациентов с нарушением кровообращения, например, с феноменом Рейно. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения склеродермии, например кожных симптомов склеродермии. В некоторых вариантах осуществления лечение склеродермии включает лечение кожных язв, таких как дигитальные язвы. Введение ингибирующего MASP-2 агента, такого как анти-MASP-2 антитело, можно использовать для уменьшения фиброзных и/или воспалительных симптомов склеродермии в пораженных тканях и/или органах.

Помимо кожных симптомов/проявлений, склеродермия может также влиять на сердце, почки, легкие, суставы и пищеварительный тракт. В некоторых вариантах осуществления лечение склеродермии включает лечение симптомов заболевания в любой одной или более из этих тканей, например, путем уменьшения фиброзных и/или воспалительных симптомов. Проблемы, связанные с легкими, являются одними из самых серьезных осложнений склеродермии и ответственны за большую часть смертельных исходов, связанных с этим заболеванием. Двумя преобладающими состояниями легких, связанными со склеродермией, являются фиброз легких и легочная гипертензия. Пациент с пораженными легкими может иметь либо одно, либо оба эти состояния. Фиброз легких, ассоциированный со склеродермией, является одним из примеров легочного фиброза, который можно лечить ингибиторами MASP-2. Склеродермия, затронувшая легкое, вызывает рубцевание (фиброз легких). Такой легочный фиброз встречается у примерно 70% пациентов с склеродермией, хотя его прогрессирование, как правило, является медленным, и симптомы сильно различаются у пациентов по степени тяжести. У пациентов, которые имеют симптомы, ассоциированные с легочным фиброзом, такие симптомы включают сухой кашель, одышку и снижение способности к физической нагрузке. У примерно 16% пациентов с некоторым уровнем фиброза легких развивается тяжелый фиброз легких. У пациентов с тяжелым легочным фиброзом наблюдается значительное снижение функции легких и альвеолит.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения склеродермии, например фиброза легких, ассоциированного со склеродермией. Введение ингибирующих MASP-2 агентов, таких как ингибирующие MASP-2 антитела, можно использовать для уменьшения фиброзных симптомов склеродермии в легких. Например, эти способы можно использовать для улучшения функции легких и/или снижения риска смерти из-за склеродермии.

У пациентов со склеродермией также часто могут быть поражены почки. Фиброз почек, ассоциированный со склеродермией, является примером фиброза почек, который можно лечить путем введения ингибирующих MASP-2 агентов, таких как анти-MASP-2 антитела. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения склеродермии, например фиброза почек, ассоциированного со склеродермией. В одном из вариантов осуществления введение ингибирующих MASP-2 антител можно использовать для уменьшения фиброзных симптомов склеродермии в почках. Например, эти способы можно использовать для улучшения функции почек, уменьшения белка в моче, уменьшения тяжести артериальной гипертензии и/или снижения риска развития почечного криза, который может привести к фатальной почечной недостаточности.

Системная красная волчанка (СКВ) является хроническим воспалительным аутоиммунным расстройством, характеризующимся спонтанной аутореактивностью В- и Т-клеток и мультиорганным иммунным повреждением и может влиять на кожу, суставы, почки и другие органы. Почти у всех людей с СКВ имеется боль в суставах, и у большинства развивается артрит. Часто пораженными суставами являются суставы пальцев, рук, запястья и колен. Общие симптомы СКВ включают артрит; усталость; общий дискомфорт, беспокойство или плохое чувство (недомогание); боль в суставах и припухлость; боль в мышцах; тошноту и рвоту; и кожную сыпь. Кроме того, симптомы также могут включать боль в животе; кровь в моче; пальцы, которые меняют цвет при сдавливании или на холоде; онемение и покалывание; и красные пятна на коже. У некоторых пациентов с СКВ имеется поражение легких или почек. Не ограничиваясь теорией, воспаление и/или фиброз в легких и почках приводит к поражению этих органов и развитию симптомов, ассоциированных с повреждением легких и/или почек. В некоторых случаях у пациентов с СКВ развивается определенное состояние почек, называемое волчаночным нефритом. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения СКВ, включающим введение эффективного количества ингибирующего MASP-2 агента, такого как анти-MASP-2 антитело. Введение ингибирующих MASP-2 антител можно использовать для уменьшения одного или более симптомов СКВ. В некоторых вариантах осуществления введение анти-MASP-2 антител используется для лечения СКВ у пациента с волчаночным нефритом. В таких случаях лечение СКВ включает лечение волчаночного нефрита, например, путем уменьшения симптомов волчаночного нефрита. В некоторых вари-

антах осуществления лечение включает лечение кожных симптомов СКВ. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение одного или более симптомов волчаночного нефрита. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение, замедление или устранение необходимости в диализе. В некоторых вариантах осуществления лечение включает уменьшение, замедление или устранение необходимости в трансплантации почек. В некоторых вариантах осуществления лечение включает задержку или предотвращение прогрессирования волчаночного нефрита до почечной недостаточности или терминальной стадии почечной недостаточности.

Волчаночный нефрит является воспалением почек и серьезным осложнением системной красной волчанки (СКВ). Что касается почек, волчаночный нефрит может привести к инвалидизирующей потере их функции. У пациентов с волчаночным нефритом в конечном итоге может развиваться почечная недостаточность, и им может потребоваться диализ или трансплантация почек. Связанные с этим осложнения, которые также можно лечить способами по изобретению, включают интерстициальный нефрит и нефротический синдром. Симптомы волчаночного нефрита включают кровь в моче, пенистый вид мочи, высокое кровяное давление, белок в моче, задержку жидкости и отеки. Другие симптомы включают признаки и симптомы фиброза почек и/или почечной недостаточности. Если болезнь не лечить, волчаночный нефрит может привести к почечной недостаточности и даже терминальной стадии почечной недостаточности.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, которое вызывает или осложняется фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание, которое вызывает или осложняется фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из склеродермии и системной красной волчанки (СКВ).

Заболевания и состояния центральной нервной системы.

В некоторых вариантах осуществления предоставляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством центральной нервной системы, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как анти-MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем местной инъекции либо непосредственно в область фиброза, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериально, внутривенно, внутримышечно, ингаляционным, назально, подкожно или другим способом парентерального введения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства центральной нервной системы.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство центральной нервной системы, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из инсульта, травматического повреждения головного мозга и повреждения спинного мозга.

Кожные заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего болезнью или расстройством кожи, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эф-

фективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую композицию MASP-2 можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции на кожу или местного применения во время операции или локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, при помощи катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериального, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного кожного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления кожное заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из фиброза кожи, заживления ран, склеродермии, системного склероза, келоидов, заболеваний соединительной ткани, рубцевания и гипертрофических рубцов.

Заболевания и состояния костей и мягких тканей скелетно-мышечной системы.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством костей или мягких тканей, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции на структуру кости или мягкой ткани или местного нанесения во время операции или локальной инъекции, например, напрямую или удаленно, например, при помощи катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериального, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства костей или мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство костей или мягких тканей, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из остеопороза и/или остеопении, связанной, например, с кистозным фиброзом, миелодиспластическими состояниями с увеличением костного фиброза, адгезивного капсулита, контрактуры Дюпюитрена и миелофиброза.

Суставные заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления предоставляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего суставным заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции на сустав, или местного нанесения во время операции или локальной инъекции, напрямую или удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриаартериального, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного суставного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления суставное заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, представляет собой артрофиброз.

Заболевания или состояния пищеварительной системы.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством пищеварительной системы, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого

как ингибирующее MASP-2 антитело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриартериального, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, анти-MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства пищеварительной системы.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство пищеварительной системы, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из болезни Крона, язвенного колита и фиброза поджелудочной железы.

Глазные заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего глазным заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения в глаз (например, глазные капли), или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного глазного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления глазное заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из передней субкапсулярной катаракты, помутнения задней капсулы, дегенерации желтого пятна и ретиальной и виреальной ретинопатии.

Заболевания или состояния репродуктивных органов.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством репродуктивных органов, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриартериального, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неперитидергических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства репродуктивных органов.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство репродуктивных органов, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из эндометриоза и болезни Пейрони.

Рубцевание, связанное с травмой.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, являющимся результатом рубцевания, связанного с травмой, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 ан-

титело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения, или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления рубцевание, связанное с травмой, выбирают из группы, состоящей из хирургических осложнений (например, хирургических спаек, в которых рубцовая ткань может образовываться между внутренними органами, вызывая контрактуру, боль, и может приводить к бесплодию), химиотерапевтический лекарственно-индуцированный фиброз, индуцированный радиацией фиброз и рубцевания, связанного с ожогами.

Дополнительные заболевания и расстройства, вызванные или осложненные фиброзом и/или воспалением.

В некоторых вариантах осуществления представляется способ профилактики, лечения, купирования, подавления и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, вызванным и/или осложненным фиброзом и/или воспалением, выбранным из группы, состоящим из трансплантации органов, фиброза молочной железы, мышечного фиброза, ретроперитонеального фиброза, фиброза щитовидной железы, фиброза лимфатических узлов, фиброза мочевого пузыря и плеврального фиброза, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту ингибирующего MASP-2 агента, такого как ингибирующее MASP-2 антитело MASP-2. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективное для подавления фиброза и/или воспаления.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время операции или путем локальной инъекции либо напрямую, либо удаленно, например, с помощью катетера. Альтернативно ингибирующий MASP-2 агент можно вводить субъекту системно, например, внутриартериально, внутривенно, внутримышечно, путем ингаляции, назально, подкожно или другим парентеральным способом введения, путем топического нанесения в глаз (например, глазные капли), или в случае неспецифических средств возможно пероральное введение. Введение можно повторять по определению врача до облегчения состояния или до достижения контроля.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) вводят в комбинации с одним или более агентами или способами лечения, подходящими для первопричинного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящей заявке различных способов и фармацевтических композиций, ингибирующее MASP-2 антитело избирательно подавляет лектиновый путь, не затрагивая при этом классический путь.

В различных аспектах настоящее изобретение относится к способам подавления неблагоприятных эффектов фиброза и/или воспаления, включающим введение ингибирующего MASP-2 агента нуждающемуся в этом субъекту. Ингибирующие MASP-2 агенты вводят в количестве, эффективном для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента у живого субъекта. При практическом осуществлении этого аспекта изобретения типичные ингибирующие MASP-2 агенты включают молекулы, подавляющие биологическую активность MASP-2 (такие как низкомолекулярные ингибиторы, анти-MASP-2 антитела (например, ингибирующие MASP-2 антитела) или блокирующие пептиды, которые взаимодействуют с MASP-2 или нарушают белок-белковое взаимодействие), и молекулы, которые уменьшают экспрессию MASP-2 (такие как молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2, MASP-2-специфические молекулы РНК и MASP-2 рибозимы), тем самым не допуская MASP-2-активацию лектинового пути комплемента. Ингибирующие MASP-2 агенты можно использовать отдельно в качестве первичной терапии или в комбинации с другими терапевтическими средствами в качестве адъювантной терапии для повышения терапевтического эффекта других медицинских препаратов.

Подавление MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компоненте системы комплемента, которые происходят в результате введения ингибирующего MASP-2 агента в соответствии со способами по изобретению: подавление генерации или продуцирования продуктов MASP-2-зависимой активации комплемента C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (MAC) (измеренные, например, как описано в примере 2), уменьшение уровня расщепления C4 и отложения C4b (измеренное, например, как описано в примере 2) или уменьшение уровня расщепления C3 и отложения C3b (измеренное, например, как описано в примере 2).

В соответствии с настоящим изобретением используются ингибирующие MASP-2 агенты, которые эффективны в подавлении фиброза и/или воспаления и проявляют обнаруживаемую антифиброзную активность и/или индуцируют уменьшение фиброза. В контексте изобретения антифиброзная активность может включать по меньшей мере одно или более из следующего:

(1) уменьшение воспаления, например, которое оценивается по активации и рекрутированию макрофагов и эндотелиальных клеток; рекрутирование и активация лимфоцитов и/или эозинофилов путем секреции ряда цитокинов/хемокинов; высвобождение цитотоксических медиаторов и фиброгенных цитокинов;

(2) снижение пролиферации клеток, синтез ВКМ (ECM) или ангиогенез; и/или

(3) уменьшение уровня отложения коллагена по сравнению с фиброзной активностью в отсутствие ингибирующего MASP-2 агента.

Оценка антифиброзного агента, такого как ингибирующий MASP-2 агент, может осуществляться путем обнаружения любым известным специалисту в данной области методом. Например, оценка антифиброзного агента может осуществляться с помощью модели UUO (как описано в настоящей заявке в примерах 12 и 14). Если оцениваемую антифиброзную активность и/или уменьшение или снижение фиброза оценивают с помощью ингибирующего MASP-2 агента, считается, что ингибирующий MASP-2 агент используется в качестве лекарственного средства для профилактики, лечения, купирования и/или подавления фиброза.

Оценку фиброза можно осуществлять периодически, например, каждую неделю или каждый месяц. Таким образом, увеличение/уменьшение фиброза и/или наличие антифиброзной активности можно оценивать периодически, например, каждую неделю или месяц. Эта оценка предпочтительно осуществляется в нескольких временных точках для данного субъекта или в одной или более временных точках для данного субъекта и здорового контроля. Оценка может проводиться через регулярные интервалы времени, например, каждую неделю или каждый месяц. Поэтому оценку можно осуществлять регулярно, например, каждую неделю или каждый месяц. Если в результате оценки обнаружено уменьшение фиброза или наличие антифиброзной активности, считается, что ингибирующий MASP-2 агент, такой как ингибирующее MASP-2 антитело, проявляет обнаруживаемую антифиброзную активность и/или индуцирует уменьшение или снижение фиброза.

Ингибирующие MASP-2 агенты в случае практического применения этого аспекта изобретения, включают, например, MASP-2 антитела и их фрагменты, ингибирующие MASP-2 пептиды, малые молекулы, растворимые MASP-2-рецепторы и ингибиторы экспрессии. Ингибирующие MASP-2 агенты могут подавлять систему MASP-2-зависимой активации комплемента, блокируя биологическую функцию MASP-2. Например, ингибирующий агент может эффективно блокировать взаимодействие белка MASP-2 с белком, препятствовать димеризации или сборке MASP-2, блокировать связывание с  $\text{Ca}^{2+}$ , интерферировать с активным участком сериновой протеазы MASP-2 или снижать уровень экспрессии белка MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты избирательно подавляют MASP-2-зависимую активацию комплемента, не затрагивая функциональную активность системы C1q-зависимой активации комплемента.

В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент, используемый в способах по изобретению, представляет собой специфический ингибирующий MASP-2 агент, который специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, со сродством связывания, по меньшей мере в 10 раз превышающим сродство связывания с другими антигенами в системе комплемента. В другом варианте осуществления ингибирующий MASP-2 агент специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, со сродством связывания, по меньшей мере в 100 раз превышающим сродство связывания с другими антигенами в системе комплемента. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент специфически связывается по меньшей мере с одним из

(i) домена CCP1-CCP2 (aa 300-431 в SEQ ID NO: 6); или

(ii) домена сериновой протеазы MASP-2 (aa 445-682 в SEQ ID NO: 6),

и подавляет активацию MASP-2-зависимого комплемента.

В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное антитело MASP-2 или его фрагмент, который специфически связывается с MASP-2. Сродство связывания ингибирующего MASP-2 агента может быть определено с помощью подходящего анализа связывания.

Полипептид MASP-2 имеет молекулярную структуру, аналогичную структуре MASP-1, MASP-3 и C1r и C1s, протеаз системы комплемента C1. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 4, кодирует типичный пример MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5) и обеспечивает человеческий полипептид MASP-2 с лидерной последовательностью (aa 1-15), который расщепляется после секреции, образуя зрелую форму человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 6). Как показано на фиг. 2, ген человеческого MASP-2 содержит двенадцать экзонов. кДНК человеческого MASP-2 кодируется экзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K и L. В результате альтернативного сплайсинга образуется белок размером 20 кДа, называемый MBL-ассоциированным белком 19, ("Map19", также называемый "sMAP") (SEQ ID NO: 2), кодируемый (SEQ ID NO: 1), получаемый из экзо-



нов В, С, D и E, как показано на фиг. 2. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 50 кодирует мышинный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51), и обеспечивает полипептид мышинного MASP-2 с лидерной последовательностью, в результате расщепления которой после секреции образуется зрелая форма мышинного MASP-2 (SEQ ID NO: 52). Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 53, кодирует крысиный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54) и обеспечивает полипептид крысиного MASP-2 с лидерной последовательностью, в результате расщепления которой после секреции образуется зрелая форма крысиного MASP-2 (SEQ ID NO: 55).

Специалисты в данной области техники поймут, что последовательности, раскрытые в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, представляют собой одиночные аллели человеческого, мышинного и крысиного MASP-2 соответственно и что возможны аллельные варианты и альтернативный сплайсинг. Аллельные варианты нуклеотидных последовательностей, приведенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, включая те, которые содержат сайленс-мутации, и те, в которых мутации приводят к изменениям аминокислотной последовательности, находятся в рамках настоящего изобретения. Аллельные варианты последовательности MASP-2 могут быть клонированы путем зондирования кДНК или геномных библиотек от разных индивидуумов в соответствии со стандартными процедурами.

Домены человеческого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) показаны на фиг. 1 и 2A и включают домены N-концевой C1r/C1s/VEGF морского ежа/домен костного морфогенетического белка (CUBI) (aa 1-121 в SEQ ID NO: 6), домен, подобный эпидермальному фактору роста (aa 122-166), второй домен CUBI (aa 167-293), а также тандем доменов регуляторных белков комплемента. Альтернативный сплайсинг гена MASP-2 приводит к образованию M<sub>Ap</sub>19, показанного на фиг. 1. M<sub>Ap</sub>19 представляет собой неферментный белок, содержащий N-терминальный CUBI-EGF участок MASP-2 с четырьмя дополнительными остатками (EQSL), полученными из экзона E, показанного на фиг. 1.

Было показано, что некоторые белки способны связываться или взаимодействовать с MASP-2 посредством белок-белковых взаимодействий. Например, известно, что MASP-2 способен связываться и формировать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые комплексы с лектиновыми белками MBL, Н-фиколином и L-фиколином. Было показано, что каждый комплекс MASP-2/лектиновый белок способен активировать комплемент посредством MASP-2-зависимого расщепления белков C4 и C2 (Ikeda, K. et al., J. Biol. Chem., 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., J. Exp. Med., 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M. et al., J. Immunol., 168:3502-3506, 2002). Исследования показали, что CUBI-EGF домены MASP-2 являются важными для связывания MASP-2 с MBL (Thielens, N.M. et al., J. Immunol., 166:5068, 2001). Также было показано, что CUBIEGFCUBII домены опосредуют димеризацию MASP-2, необходимую для формирования активного комплекса MBL (Wallis, R. et al., J. Biol. Chem., 275:30962-30969, 2000). Отсюда следует, что ингибирующие MASP-2 агенты характеризуются своей способностью связываться или взаимодействовать с MASP-2 участками мишенями, играющими важную роль в процессе MASP-2-зависимой активации комплемента.

#### Анти-MASP-2 антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта настоящего изобретения ингибирующий MASP-2 агент включает анти-MASP-2 антитело, которое подавляет систему MASP-2-зависимой активации комплемента. Анти-MASP-2 антитела, пригодные для осуществления данного аспекта настоящего изобретения, включают поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела, полученные от любого продуцирующего антитела млекопитающего, и данные антитела могут быть мультиспецифическими, химерными, гуманизированными, анти-идиотипическими антителами и фрагментами антител. Фрагменты антител включают Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагменты, scFv фрагменты и одноцепочечные антитела, описанные ниже.

Анти-MASP-2 антитела могут быть подвергнуты скринингу на способность подавления системы MASP-2-зависимой активации комплемента и на антифибротную активность и/или подавление почечного поражения, ассоциированного с протеинурией или адриамицин-индуцированной нефропатии, с помощью описанного в настоящей заявке анализа. Некоторые анти-MASP-2 антитела были описаны в научной литературе, несколько из них перечислены в табл. 1. Например, как показано в настоящей заявке в примерах 10 и 11, было найдено, что анти-MASP-2 антитела Fab2 блокируют MASP-2-зависимую активацию комплемента. Как показано в примере 12 и описано в WO2012/151481, включенной в настоящее описание в виде ссылки, было определено, что полностью человеческие анти-MASP-2 антитела scFv (например, OMS646) блокируют MASP-2-зависимую активацию комплемента. Как описано в примере 13, а также в WO 024141442, включенной в настоящее описание в виде ссылки, анти-MASP-2 антитела, несущие пептид SGMI-2, и их фрагменты, проявляющие ингибирующую MASP-2 активность, были получены путем слияния с аминокислотной последовательностью пептида SGMI-2 (SEQ ID NO: 72, 73 или 74) на amino- или карбоксильном конце тяжелой и/или легкой цепи человеческого анти-MASP-2 антитела (например, OMS646-SGMI-2).

Соответственно в одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент для использования в способах по изобретению содержит человеческое антитело, такое как, например, OMS646. Соответственно в одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент для использования в композициях и способах по заявленному изобретению содержит человеческое антитело, которое связы-

вает полипептид, состоящий из человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 6), причем антитело содержит

(I) (a) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий

i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 31-35 в SEQ ID NO: 67; и

ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 50-65 в SEQ ID NO: 67; и

iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 95-107 в SEQ ID NO: 67; и

b) вариабельный участок легкой цепи, содержащий

i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 24-34 в SEQ ID NO: 69; и

ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 50-56 в SEQ ID NO: 69; и

iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 89-97 в SEQ ID NO: 69; или

(II) его вариант, включающий

вариабельный участок тяжелой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью (например, с по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 67; и

вариабельный участок легкой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью (например, с по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей некоторое количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, распознаваемом референсным антителом OMS646, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 69. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент, используемый в способах по изобретению, содержит человеческое антитело OMS646.

Таблица 1

Приведенные в качестве примера masp-2-специфические антитела

| Антиген                                                                       | Тип антитела                  | Ссылка                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Рекомбинантный MASP-2                                                         | Крысиное поликлональное       | Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000                  |
| Фрагмент рекомбинантного человеческого CCP1/2-SP (MoAb 8B5)                   | Крысиное MoAb (подкласс IgG1) | Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003 |
| Рекомбинантный человеческий MAP19 (MoAb 6G12) (перекрестная реакция с MASP-2) | Крысиное MoAb (подкласс IgG1) | Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003 |

|                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| hMASP-2                                              | Мышиное MoAb (S/P)<br>Мышиное MoAb (N-терм.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Peterson, S.V., et al.,<br>Mol. Immunol. 35:409,<br>April 1998 |
| hMASP-2 (домен<br>CCP1-CCP2-SP)                      | крысиное MoAb: Nimoab101,<br>продуцированное<br>гибридомной клеточной<br>линией 03050904 (ECACC)                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2004/106384                                                 |
| hMASP-2<br>(полноразмерный,<br><i>his</i> -меченный) | мышинное MoAbs:<br>NimoAb104,<br>продуцированное<br>гибридомной клеточной<br>линией M0545YM035 (DSMZ)<br>NimoAb108,<br>продуцированное<br>гибридомной клеточной<br>линией M0545YM029 (DSMZ)<br>NimoAb109 продуцированное<br>гибридомной клеточной<br>линией M0545YM046 (DSMZ)<br>NimoAb110 продуцированное<br>гибридомной клеточной<br>линией M0545YM048 (DSMZ) | WO 2004/106384                                                 |
| Крысиный MASP-2<br>(полноразмерный)                  | фрагменты анти-MASP-2<br>антитела Fab2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Пример 10                                                      |
| hMASP-2<br>(полноразмерный)                          | Полностью человеческие<br>клоны scFv                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Пример 12 и<br>WO2012/151481                                   |
| hMASP-2<br>(полноразмерный)                          | Анти-MASP-2 антитела,<br>несущие пептид SGMI-2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Пример 13 и<br>WO2014/144542                                   |

#### Анти-MASP-2 антитела со сниженной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта настоящего изобретения анти-MASP-2 антитела имеют сниженную эффекторную функцию для уменьшения воспаления, которое может возникать при активации классического пути комплемента. Было обнаружено, что способность молекул IgG запускать классический путь активации комплемента связана с Fc-участком молекулы (Duncan, A.R. et al., Nature, 332:738-740, 1988). Молекулы IgG, у которых Fc-участок был удален посредством ферментного расщепления, лишены данной эффекторной функции (см. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). В соответствии с этим антитела со сниженной эффекторной функцией могут быть получены в результате удаления Fc-участка молекулы, содержащей генноинженерную Fc-последовательность, которая имеет минимальную эффекторную функцию, эта молекула может относиться как к человеческому изотипу IgG2, так и изотипу IgG4.

Антитела со сниженной эффекторной функцией могут быть получены при помощи стандартных молекулярных биологических манипуляций с Fc-участком тяжелых цепей IgG, как описано в настоящей заявке и показано Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol., 10:241-250, 1993; и Rodrigues et al., J. Immunol., 151:6954-6961, 1998. Антитела со сниженной эффекторной функцией также включают человеческие изотипы IgG2 и IgG4, которые имеют сниженную способность активировать комплемент и/или вступать во взаимодействие 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 полноценные человеческие антитела, специфические к человеческому MASP-2, включающие изотипы IgG2 или IgG4, могут быть получены одним из нескольких способов, известных специалисту в данной области техники, как описано у Vaughan, T.J. et al., Nature Biotechnical, 16:535-539, 1998.

Получение анти-MASP-2 антител.

Анти-MASP-2 антитела могут быть получены с помощью полипептидов MASP-2 (например, полноразмерного MASP-2) или антигенных пептидов, несущих эпитоп MASP-2 (например, часть полипептида MASP-2). Иммуногенные пептиды могут состоять всего из пяти аминокислотных остатков. Напри-

мер, полипептид MASP-2, содержащий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, может быть использован для индукции анти-MASP-2 антител, которые могут быть использованы в способе по настоящему изобретению. Известно, что конкретные домены MASP-2, вовлеченные в белок-белковые взаимодействия, такие как домены CUBI и CUBIEGF, а также область, содержащая активный участок сериновой протеазы, можно экспрессировать в виде рекомбинантных полипептидов, как описано в примере 3, и использовать в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, содержащие участок, состоящий из по меньшей мере 6 аминокислот полипептида MASP-2 (SEQ ID NO: 6), также можно использовать для индукции MASP-2 антител. Дополнительные примеры полученных антигенов MASP-2, обладающих способностью индуцировать MASP-2 антитела, приведены ниже в табл. 2. Пептиды и полипептиды MASP-2, используемые для генерации антител, могут быть выделены в виде природных полипептидов или рекомбинантных или синтетических пептидов и каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов, таких как MASP-2A, как описано далее в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта настоящего изобретения анти-MASP-2 антитела получены с использованием трансгенной линии мышей, как описано ниже в настоящей заявке.

Антигены, способные продуцировать анти-MASP-2 антитела, также включают слитые полипептиды, например полипептиды, полученные в результате слияния MASP-2 или его части с полипептидом иммуноглобулина или белком, связывающим мальтозу. Полипептидный иммуноген может быть представлен полноразмерной молекулой или ее частью. Если часть полипептида представлена гаптенем, такая часть может быть преимущественно присоединена или связана для иммунизации с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или столбнячный анатоксин).

Таблица 2

## Антигены MASP-2

|                                   |                                                                             |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:                        | Аминокислотная последовательность                                           |
| SEQ ID NO: 6                      | Человеческий белок MASP-2                                                   |
| SEQ ID NO: 51                     | Мышиный белок MASP-2                                                        |
| SEQ ID NO: 8                      | Домен CUBI человеческого MASP-2<br>(aa 1-121 в SEQ ID NO:6)                 |
| SEQ ID NO: 9                      | Домены CUBIEGF человеческого MASP-2<br>(aa 1-166 в SEQ ID NO:6)             |
| SEQ ID NO: 10                     | Домены CUBIEGFCUBII человеческого MASP-2<br>(aa 1-293 в SEQ ID NO:6)        |
| SEQ ID NO: 11                     | Домен EGF человеческого MASP-2<br>(aa 122-166 в SEQ ID NO:6)                |
| SEQ ID NO: 12                     | Домен сериновой протеазы человеческого MASP-2<br>(aa 429-671 в SEQ ID NO:6) |
| SEQ ID NO: 13<br>GKDSCRGDAGGALVFL | Мутантная форма с инактивированным доменом сериновой протеазы               |

|                                                                   |                                                       |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                                                                   | (aa 610-625 в SEQ ID NO:6 с мутантным Ser 618)        |
| SEQ ID NO: 14<br>TPLGPKWPEPVFGRL                                  | Человеческий пептид CUBI                              |
| SEQ ID NO: 15:<br>TAPPGYRLRLYFTHFDLEL<br>SHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ | Человеческий пептид CUBI                              |
| SEQ ID NO: 16:<br>TFRSDYSN                                        | MBL-связывающий участок в<br>человеческом домене CUBI |
| SEQ ID NO: 17:<br>FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTG<br>F                   | MBL-связывающий участок в<br>человеческом домене CUBI |
| SEQ ID NO: 18<br>IDECQVAPG                                        | пептид EGF                                            |
| SEQ ID NO: 19<br>ANMLCAGLESGGKDCRGDSGGAL<br>V                     | Пептид из активного участка сериновой<br>протеазы     |

#### Поликлональные антитела.

Поликлональные анти-MASP-2 антитела могут быть получены путем иммунизации животных полипептидом MASP-2 или его иммуногенным участком способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. См., например, "Green et al., Production of Polyclonal Antisera", в *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), p. 105. Иммуногенность полипептида MASP-2 можно повысить с помощью адъюванта, включая минеральные гели, такие как гидроксид алюминия или адъювант Фрейнда (полный или неполный), поверхностно-активных веществ, таких как лизолецитин, высокомолекулярных спиртов - плуронионов, полианионов, масляных эмульсий, гемоцианина фиссуреллы и динитрофенола. Для получения поликлональных антител обычно используют животных, таких как лошади, коровы, собаки, куры, крысы, мыши, кролики, морские свинки, козы или овцы. В качестве альтернативы, анти-MASP-2 антитело, используемое в настоящем изобретении, может также быть получено от человекообразной обезьяны. Общий метод получения диагностически и терапевтически полезных антител у бабуинов можно найти, например, у Goldenberg et al., публикация международной заявки на патент WO 91/11465, и у Losman, M.J. et al., *Int. J. Cancer*, 46:310, 1990. Затем с помощью стандартных общеизвестных процедур из крови таких иммунизированных животных получают сыворотку, содержащую иммунологически активные антитела.

#### Моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное анти-MASP-2 антитело. Моноклональные Анти-MASP-2 антитела являются высокоспецифичным эпитопом, направленным против одного эпитопа MASP-2. Как используется в настоящем описании, модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не подразумевает получение антител каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела могут быть получены любым методом, предусматривающим получение молекул антител в культуре стабильной клеточной линии, таким как, например, метод гибридом, описанный у Kohler, G. et al., *Nature*, 256:495, 1975, или они могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США 4816567, Cabilly). Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговой библиотеки антител методами, описанными у Clackson, T. et al., *Nature*, 352:624-628, 1991, и Marks, J.D. et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991. Подобные антитела могут принадлежать любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и любому их подклассу.

Например, моноклональные антитела могут быть получены путем инъекций подходящему млекопитающему (например, мыши линии BALB/c) композиции, содержащей полипептид MASP-2 или его часть. После заранее определенного периода времени, у мыши выделяют спленоциты, и ресуспендируют их в культуральной среде. Затем осуществляют слияние спленоцитов с иммортализованной клеточной линией для образования гибридомы. Образованные гибридомы выращивают в культуре клеток и подвергают их скринингу на способность к продуцированию моноклональных антител к MASP-2. Далее в настоящем описании приведены примеры получения моноклональных анти-MASP-2 антител (см. также *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley & Sons, p. 2.5.1-2.6.7, 1991.)

Человеческие моноклональные антитела могут быть получены от трансгенных мышей, созданных методами геной инженерии для продуцирования человеческих антител в ответ на антигенный стимул. В этом методе элементы локуса тяжелых и легких цепей человеческого иммуноглобулина вводят в линии

мышей, полученные из клеточных линий эмбриональных стволовых клеток, которые содержат направленные разрушения локусов тяжелых и легких цепей эндогенного иммуноглобулина. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела, специфические к человеческим антигенам, таким как антигены MASP-2, описанные в настоящем изобретении, и этих мышей можно использовать для получения гибридом, секретирующих антитела к человеческому MASP-2, путем слияния В-клеток, полученных от таких животных, с подходящими клеточными линиями миеломы обычным методом Келера-Мильтштейна, как описано ниже в настоящей заявке. Трансгенные мыши с геномом человеческого иммуноглобулина являются коммерчески доступными (например, от Abgenix, Inc., Fremont, C.A.; Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Способы получения человеческих антител от трансгенной мыши описаны в научной литературе, например Green, L.L et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N. et al., *Nature*, 368:856, 1994; и Taylor, L.D. et al., *Int. Immun.*, 6:579, 1994.

Моноклональные антитела могут быть выделены и очищены от гибридомной культуры различными хорошо известными методами. Такие методы выделения включают аффинную хроматографию на сефарозе с белком А, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию (см., например, Coligan, p. 2.7.1-2.7.12, p. 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., vol. 10, p. 79-104, 1992).

После получения поликлональные, моноклональные антитела или антитела, произведенные фагами, сначала тестируют на специфическое связывание с MASP-2. Для определения антител, специфически связывающихся с MASP-2, можно использовать множество различных способов, известных специалисту в данной области техники. Иллюстративные примеры анализа, проводимые стандартными способами, включают вестерн-блот или анализ иммунопреципитации (например, как описано у Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, иммуноферментный анализ (ИФА), дот-блоттинг, анализ подавления или конкурентный анализ (как описано у Harlow и Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После определения антител, способных специфически связываться с MASP-2, анти-MASP-2 антитела тестируют на возможность функционировать в качестве ингибирующего MASP-2 агента одним из нескольких методов оценки, таким как, например, анализ лектин-специфического расщепления C4 (описанный в примере 2), анализ отложения C3b (описанный в примере 2) или анализ отложения C4b (описанный в примере 2).

Сродство связывания анти-MASP-2 моноклональных антител может быть легко определена специалистом в данной области техники (см., например, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.*, 51:660-672, 1949). В одном из вариантов осуществления моноклональные анти-MASP-2 антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, связываются с MASP-2 со сродством связывания  $<100$  нмоль, предпочтительно  $<10$  нмоль и более предпочтительно  $<2$  нмоль.

Химерные/гуманизированные антитела.

Моноклональные антитела, используемые в способе по настоящему изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям антител, выделенным из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител (патент США 4816567, Cabilly; Morrison, S.L. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 81:6851-6855, 1984).

Одна из форм химерного антитела, используемого в настоящем изобретении, представлена гуманизированным моноклональным анти-MASP-2 антителом. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представлены химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, выделенную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела получают путем переноса нечеловеческих (например, мышинных) определяющих комплементарность областей (CDR) из переменных участков тяжелых и легких цепей иммуноглобулина мыши в человеческий переменный домен. Как правило, остатки человеческих антител затем замещают в каркасных областях нечеловеческих прототипов. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в антителах реципиента или в антителах донора. Данные модификации производятся с целью дальнейшего улучшения эффективности антител. В общем случае гуманизированное антитело может содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все Fv-каркасные области являются областями из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Подробное описание можно найти у Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992.

Гуманизированные антитела, используемые в настоящем изобретении, включают человеческие моноклональные антитела, включающие по меньшей мере MASP-2-связывающий участок CDRH3. Кроме того, Fc-участки могут быть заменены таким образом, чтобы продуцировались IgA или IgM, а также че-

ловеческие IgG антитела. Таким образом, гуманизированные антитела найдут, в частности, клиническое применение, так как они будут специфически распознавать человеческий MASP-2, не вызывая у человека иммунного ответа против самого антитела. Как следствие, они лучше подходят для введения человеку *in vivo*, особенно когда требуется повторное или длительное введение.

Пример получения гуманизированного анти-MASP-2 антитела из мышинового моноклонального анти-MASP-2 антитела приведен в примере 6. Методы получения гуманизированных моноклональных антител также описаны, например, у 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. Immunol.*, 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., p. 399-434, 1996; и в патенте США 5693762, Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые синтезируют гуманизированные антитела из специфических участков антитела, например, Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела.

Анти-MASP-2 антитела также могут быть получены при помощи рекомбинантных методов. Например, человеческие антитела могут быть получены с использованием экспрессионной библиотеки человеческого иммуноглобулина (доступные, например, у Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для получения фрагментов человеческих антител (VH, VL, Fv, Fd, Fab or F(ab')<sub>2</sub>). Эти фрагменты затем используются для конструирования полноценных человеческих антител методами, аналогичными методом, используемым для получения химерных антител.

Анти-идиотипические антитела.

После определения анти-MASP-2 антител с нужной ингибирующей активностью, эти антитела можно использовать для получения анти-идиотипических антител, которые схожи с частью MASP-2, методами, хорошо известными в данной области. См., например, Greenspan, M.S. et al., *FASEB J.*, 7:437, 1993. Например, антитела, которые связываются с MASP-2 и конкурентно подавляют MASP-2-белковые взаимодействия, необходимые для активации комплемента, могут быть использованы для получения анти-идиотипических антител, которые имеют сходство с MBL-связывающим участком белка MASP-2 и, следовательно, связываются и нейтрализуют связывание лигандов MASP-2, таких как, например, MBL.

Фрагменты иммуноглобулина.

Ингибирующие MASP-2 агенты, используемые в способе по изобретению, охватывают не только интактные молекулы иммуноглобулинов, но и хорошо известные фрагменты, включая Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты, димеры, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

Хорошо известно, что только небольшая часть молекулы антитела, паратоп, участвует в связывании антитела с его эпитопом (см., например, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Участки pFc' и Fc антитела являются эффекторами классического пути активации комплемента, но не участвуют в связывании антигенов. Антитело, от которого ферментивно отщеплен участок pFc' или которое было продуцировано без участка pFc', обозначено F(ab')<sub>2</sub> фрагментом и содержит оба антигенсвязывающих участка интактного антитела. Выделенный фрагмент F(ab')<sub>2</sub> относится к бивалентному моноклональному фрагменту из-за наличия двух антигенсвязывающих участков. Аналогично антитело, от которого ферментивно отщеплен участок Fc, или которое было продуцировано без участка Fc, обозначено Fab фрагментом и содержит один из антигенсвязывающих участков молекулы интактного антитела.

Фрагменты антител могут быть получены путем протеолитического гидролиза, таким как пепсиновый или папаиновый гидролиз цельных антител, стандартными способами. Например, фрагменты антитела могут быть получены ферментным расщеплением антител пепсином с получением фрагмента 5S, обозначенного F(ab')<sub>2</sub>. Этот фрагмент может быть далее расщеплен с помощью агента, восстанавливающего тиол, с получением 3,5S Fab' моновалентных фрагментов. Необязательно, реакцию расщепления можно осуществлять с использованием группы, блокирующей сульфгидрильные группы, полученные в результате расщепления дисульфидных связей. В качестве альтернативы ферментное расщепление с помощью пепсина дает два моновалентных фрагмента Fab и фрагмент Fc. Эти способы описаны, например, в патенте США 4331647, Goldenberg; Nisonoff, A. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89:230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J.*, 73:119, 1959; Edelman et al., *Methods in Enzymology*, 1:422, Academic Press, 1967; и у Coligan, p. 2.8.1-2.8.10, 2.10-2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления использование фрагментов антител с отсутствующим Fc-участком является предпочтительным, поскольку позволяет избежать активацию классического пути комплемента, которая инициируется путем связывания Fc с рецептором Fcγ. Существует несколько способов продуцирования MoAb, которое не влияет на взаимодействия рецептора Fcγ. Например, Fc-участок моноклонального антитела может быть удален химическим способом путем частичного расщепления с участием протеолитических ферментов (например, расщепления фицином) с получением, например, антигенсвязывающих фрагментов антител, таких как фрагменты Fab или F(ab)<sub>2</sub> (Mariani, M. et al., *Mol. Im-*

munol., 28:69-71, 1991). Альтернативно изотип  $\gamma 4$  человеческого IgG, который не связывается с рецепторами Fc $\gamma$ , может быть использован для создания гуманизированного антитела, как описано в настоящей заявке. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, у которых отсутствует Fc-домен, также могут быть созданы рекомбинантными методами, описанными в настоящей заявке.

#### Фрагменты одноцепочечных антител.

Альтернативно можно создать MASP-2-специфические молекулы, связывающие одну полипептидную цепь, в которых Fv-участки тяжелой и легкой цепей связаны между собой. Fv-фрагменты могут быть связаны посредством пептидного линкера с образованием одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Такие одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают путем создания структурного гена, содержащего последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, связанные с олигонуклеотидом. Структурный ген встраивают в вектор экспрессии, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как E.coli. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют единичную полипептидную цепь с пептидным линкером, связывающим два V домена. Способы получения scFv описаны, например, в Whitlow et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology", 2:97, 1991; Bird et al., Science, 242:423, 1988; патент США 4946778, Ladner; Pack, P. et al., Bio/Technology, 11:1271, 1993.

В качестве иллюстрирующего примера, MASP-2-специфический scFv может быть получен, подвергая лимфоциты воздействию полипептида MASP-2 *in vitro* и селекции библиотек антител методом фагового дисплея в фагах или аналогичных векторах (например, путем использования иммобилизованных или меченых белков или пептидов MASP-2). Гены, кодирующие полипептиды, содержащие потенциальные домены, связывающие полипептиды MASP-2, могут быть получены путем скрининга любых пептидных библиотек, отображенных на фаге или бактериях, таких как E.coli. Эти случайные пептидные фаговые библиотеки могут быть использованы для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с MASP-2. Методы создания и скрининга таких случайных пептидных дисплейных библиотек хорошо известны (см. патент США 5223409, Lardner; патент США 4946778, Ladner; патент США 5403484, Lardner; патент США 5571698, Lardner; и Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996), а случайные пептидные дисплейные библиотеки и наборы для скрининга таких библиотек являются коммерчески доступными, например от CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Mass.) и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Другой формой фрагмента анти-MASP-2 антитела, используемого в данном аспекте настоящего изобретения, является пептид, кодирующий один определяющий комплементарность участок (CDR), который связывается с эпитопом на антигене MASP-2 и подавляет MASP-2-зависимую активацию комплемента. CDR пептиды ("минимальные единицы распознавания") могут быть получены путем конструирования генов, кодирующих CDR представляющего интерес антитела. Такие гены получают, например, методом полимеразной цепной реакции для синтеза вариативного участка из РНК клетки, продуцирующей антитела (см., например, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), p. 166, Cambridge University Press, 1995; и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), p. 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Анти-MASP-2 антитела, описанные в настоящей заявке, вводят нуждающемуся в этом субъекту, для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий MASP-2 агент представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное анти-MASP-2 антитело со сниженной эффекторной функцией.

#### Пептидные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта настоящего изобретения ингибирующий MASP-2 агент содержит выделенные пептидные ингибиторы MASP-2, в том числе выделенные природные пептидные ингибиторы и синтетические пептидные ингибиторы, которые подавляют систему MASP-2-зависимой активации комплемента. Как указано в настоящем описании, термин "выделенные пептидные ингибиторы MASP-2" относится к пептидам, которые ингибируют MASP-2-зависимую активацию комплемента путем связывания с MASP-2, конкуренции с MASP-2 за связывание с другой молекулой распознавания (например, MBL, Н-фиколином, М-фиколином или L-фиколином) при активации лектинового пути и/или путем прямого взаимодействия с MASP-2, таким образом подавляя MASP-2-зависимую активацию комплемента, при этом эти ингибиторы являются по существу чистыми и практически не содержат другие вещества, с которыми они могут находиться в естественных условиях, настолько, что являются пригодными для применения по целевому назначению.

Пептидные ингибиторы успешно используются *in vivo* с целью подавления белок-белковых взаимодействий и каталитического участка. Например, пептидные ингибиторы молекул адгезии, структурно родственные LFA-1, недавно были одобрены для клинического применения при коагулопатии (Ohman, E.M. et al., European Heart J., 16:50-55, 1995). Было показано, что короткие линейные пептиды (<30 аминокислот) обладают способностью предупреждать или препятствовать интегринзависимой адге-



зии (Murayama, O. et al., J. Biochem., 120:445-51, 1996). Более длинные пептиды от 25 до 200 аминокислотных остатков также успешно использовались для блокирования интегринзависимой адгезии (Zhang, L. et al., J. Biol. Chem., 271(47):29953-57, 1996). Как правило, более длинные пептидные ингибиторы имеют более высокое сродство и/или более низкие скорости диссоциации, чем короткие пептиды и, следовательно, могут быть более эффективными ингибиторами. Также было показано, что циклические пептидные ингибиторы являются эффективными ингибиторами интегринов *in vivo* при лечении воспалительных заболеваний человека (Jackson, D.Y. et al., J. Med. Chem., 40:3359-68, 1997). Один из способов получения циклических пептидов включает синтез пептидов, в котором терминальные аминокислоты пептида являются цистеинами, что позволяет пептиду существовать в циклической форме за счет образования дисульфидных связей между терминальными аминокислотами, что, как было показано, улучшает сродство связывания и период полувыведения *in vivo* при лечении гемопоэтических неоплазий (например, патент США 6649592, Larson).

Синтетические пептидные ингибиторы MASP-2.

Пептиды, ингибирующие MASP-2, используемые в способах данного аспекта настоящего изобретения, представляют собой аминокислотные последовательности, которые имитируют участки-мишени, важные для функции MASP-2. Размеры ингибирующих пептидов, используемых на практике в способах по настоящему изобретению, находятся в пределах от примерно 5 аминокислот до примерно 300 аминокислот. В табл. 3 представлен список приведенных в качестве примера ингибирующих пептидов, которые могут быть использованы при практическом применении этого аспекта настоящего изобретения. Ингибирующий MASP-2 пептид-кандидат может быть протестирован на способность функционировать в качестве ингибирующего MASP-2 агента в одном или более анализах, включая, например, анализ лектин-специфического расщепления C4 (описанном в примере 2) и анализ отложения C3b (описанном в примере 2).

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 пептиды получают из полипептидов MASP-2 и выбирают из полноразмерного зрелого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) или из конкретного домена белка MASP-2, такого как, например, домен CUBI (SEQ ID NO: 8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), домен EGF (SEQ ID NO: 11) и домен сериновой протеазы (SEQ ID NO: 12). Как описывалось ранее, было показано, что участки CUBEGFCUBII необходимы для димеризации и связывания с MBL (Thielens et al., *supra*). В частности, в исследовании по идентификации человека, несущего гомозиготную замену Asp105 на Gly105, приводящую к потере MASP-2 из комплекса MBL, было показано, что пептидная последовательность TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) в домене CUBI MASP-2 принимает участие в связывании с MBL (Stengaard-Pedersen, K. et al., New England J. Med., 349:554-560, 2003).

В некоторых вариантах осуществления пептиды, ингибирующие MASP-2, получали из лектиновых пептидов, которые связываются с MASP-2 и участвуют в активации лектинового пути комплемента. Были определены несколько разных лектинов, которые участвуют в этом пути, включая маннансвязывающий 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 в виде олигомеров или гомотримерных субъединиц, каждая из которых имеет N-терминальные коллагеноподобные волокна, с доменами узнавания углеводов. Было показано, что эти разные лектины связываются с MASP-2 и лектин/MASP-2 комплекс активирует комплемент через расщепление белков C4 и C2. Н-фиколин имеет аминокислотный терминальный участок из 24 аминокислот, коллагеноподобный домен с 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, шеечный домен из 12 аминокислот и фибриноген-подобный домен из 207 аминокислот (Matsushita, M. et al., J. Immunol., 168:3502-3506, 2002). Н-фиколин связывается с GlcNAc и агглютинирует человеческие эритроциты, покрытые ЛПС, полученные из *S. typhimurium*, *S. minnesota* и *E.coli*. Было показано, что Н-фиколин связывается с MASP-2 и MAP 19 и активирует лектиновый путь комплемента. Id. L-фиколин/P35 также связывается с GlcNAc и, как было показано, образует связи с MASP-2 и MAP 19 в человеческой сыворотке, и этот комплекс активирует лектиновый путь комплемента (Matsushita, M. et al., J. Immunol., 164:2281, 2000). Соответственно ингибирующие MASP-2 пептиды, используемые в настоящем изобретении, могут содержать участок, состоящий из по меньшей мере 5 аминокислот, выбранных из белка MBL (SEQ ID NO: 21), белка Н-фиколин (номер доступа в Genbank NM\_173452), белка М-фиколин (номер доступа в Genbank 000602) и белка L-фиколин (номер доступа Genbank NM\_015838).

Более конкретно, ученые идентифицировали связывающий MASP-2 участок в MBL, состоящий из 12 триплетов Gly-X-Y "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO: 26), которые расположены между шарнирным и шеечным участками в С-терминальной части коллагеноподобного домена MBP (Wallis, R et al., J. Biol. Chem., 279:14065, 2004). Этот связывающий MASP-2 участок является также очень консервативным у человеческого Н-фиколина и человеческого L-фиколина. Описан консенсусный участок связывания, который представлен во всех трех лектиновых белках, содержащий аминокислотную последовательность "OGK-X-GP" (SEQ ID NO: 22), где буква "O" означает гидроксипролин, а буква "X" представляет собой гидрофобный остаток (Wallis et al., 2004, *supra*). Соответственно в некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие пептиды, используемые в этом аспекте настоящего изобретения, имеют в длину по меньшей мере 6 аминокислот и

содержат 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), связываются с MASP-2 in vitro (Wallis et al., 2004, supra). Для усиления связывания с MASP-2 могут быть синтезированы пептиды, фланкированные двумя триплетами GPO на каждом конце ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O", SEQ ID NO: 25) для повышения вероятности образования тройных спиралей, обнаруженных у нативного белка MBL (как описано у Wallis, R. et al., J. Biol. Chem., 279:14065, 2004).

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

MASP-2 ингибирующие пептиды также могут быть 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

Приведенные в качестве примера MASP-2 ингибирующие пептиды

| SEQ ID NO                                                                                                                    | Источник                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 6                                                                                                                 | Человеческий белок MASP-2                                                                                 |
| SEQ ID NO: 8                                                                                                                 | Домен CUBI MASP-2 (aa 1-121 в SEQ ID NO:6)                                                                |
| SEQ ID NO: 9                                                                                                                 | Домен CUBIEGF MASP-2 (aa 1-166 в SEQ ID NO:6)                                                             |
| SEQ ID NO: 10                                                                                                                | Домены CUBIEGFCUBII MASP-2 (aa 1-293 в SEQ ID NO:6)                                                       |
| SEQ ID NO: 11                                                                                                                | Домен EGF MASP-2 (aa 122-166)                                                                             |
| SEQ ID NO: 12                                                                                                                | Домен сериновой протеазы MASP-2 (aa 429-671)                                                              |
| SEQ ID NO: 16                                                                                                                | MBL-связывающий участок в MASP-2                                                                          |
| SEQ ID NO: 3                                                                                                                 | Человеческий MAr19                                                                                        |
| SEQ ID NO: 21                                                                                                                | Человеческий белок MBL                                                                                    |
| SEQ ID NO: 22<br>OGK-X-GP,<br>Где «O» является<br>гидроксипролином, и «X»<br>является гидрофобным<br>аминокислотным остатком | Синтетический пептид, консенсусный<br>участок связывания из человеческого MBL и<br>человеческих фиколинов |
| SEQ ID NO: 23<br>OGKLG                                                                                                       | Основная часть сайта связывания<br>человеческого MBL                                                      |
| SEQ ID NO: 24<br>GLR-GLQ-GPO-GKL-GPO-G                                                                                       | Человеческие MBP триплеты 6-10-<br>демонстрирующие связывание с MASP-2                                    |
| SEQ ID NO: 25<br>GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOG<br>GPOGPO                                                                            | Человеческие MBP триплеты с GPO,<br>добавленные для усиления образования<br>тройных спиралей              |
| SEQ ID NO: 26<br>GKDGRDGTKEKEGEPGQGLRGL<br>QGPOGKLGPONOGPSGSGPK<br>GQKGDGKS                                                  | Человеческие MBP триплеты 1-17                                                                            |
| SEQ ID NO: 27<br>GAOGSOGKEKGAOGPGPOGPOG<br>KMGPKGEOGDO                                                                       | Человеческий Н-фиколин (Hataka)                                                                           |

|                                                                                        |                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 28<br>GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRG<br>ERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO                     | Человеческий L-фиколин P35                   |
| SEQ ID NO: 29<br>LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI                                              | Человеческий сайт расщепления C4             |
| SEQ ID NO: 72<br>LEVTCPEPGTTFKDKNTCRCGSDG<br>KSAVCTKLWCNQ                              | SGMI-2L (полноразмерный)                     |
| SEQ ID NO: 73<br>TCEPGTTFKDKNTCRCGSDGKSA<br>VCTKLWCNQ                                  | SGMI-2M (укороченный вариант, средняя длина) |
| SEQ ID NO: 74<br>TCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ                                                  | SGMI-2S (укороченный вариант, короткий)      |
| Примечание: буква «O» означает гидроксипролин, буква «X» означает гидрофобный остаток. |                                              |

Пептиды, полученные из сайта расщепления C4, а также другие пептиды, ингибирующие участок сериновой протеазы MASP-2, могут быть химически модифицированы таким образом, чтобы они стали необратимо действующими ингибиторами протеазы. Например, подходящие модификации могут включать без ограничения галогенметилкетоны (Br, Cl, I, F) на С-терминальном конце, Asp или Glu или могут быть присоединены к функциональным боковым цепям; галогенацетиловые (или другие  $\alpha$ -галогенацетиловые) группы на аминоклупах или других функциональных боковых цепях; эпоксид- или имин-содержащие группы на амино- или карбоксил-терминальных концах или функциональных боковых цепях; или сложные эфиры, имидаты на амино- или карбоксил-терминальных концах или функциональных боковых цепях. Такие модификации могут обеспечивать преимущество при необратимом подавлении фермента за счет ковалентного присоединения пептида. Это может привести к уменьшению эффективной дозы и/или снижению частоты введения пептидного ингибитора.

Дополнительно к описанным выше ингибирующим пептидам, ингибирующие MASP-2 пептиды, используемые в способе по настоящему изобретению, включают пептиды, содержащие MASP-2-связывающий участок CDR3 в анти-MASP-2 MoAb, полученном описанным в настоящей заявке способом. Последовательность участков CDR для применения в синтезе пептидов может быть определена известными в данной области способами. Вариабельный участок тяжелой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно находится в пределах от 100 до 150 аминокислот. Вариабельный участок легкой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно находится в пределах от 80 до 130 аминокислот. Последовательности CDR внутри вариабельных участков тяжелой и легкой цепей включают последовательности, состоящие только из примерно 3-25 аминокислот, которые могут быть легко секвенированы специалистом в данной области техники.

Специалистам в данной области техники известно, что по существу гомологичные варианты описанных выше ингибирующих MASP-2 пептидов также будут проявлять MASP-2-ингибирующую активность. Иллюстративные варианты включают без ограничения пептиды, содержащие вставки, делеции, замены и/или дополнительные аминокислоты на карбокси-терминальных или амино-терминальных участках заявленных пептидов, и их смеси. Соответственно такие гомологичные пептиды, имеющие MASP-2-ингибирующую активность, также предполагаются для использования в способах по настоящему изобретению. Описанные пептиды также могут включать повторяющиеся мотивы и другие модификации с консервативными заменами. Консервативные варианты описаны в настоящей заявке и включают замену одной аминокислоты другой аминокислотой с аналогичным зарядом, аналогичного размера, аналогичной гидрофобностью и т.д.

Ингибирующие MASP-2 пептиды могут быть модифицированы для увеличения растворимости и/или получения максимального положительного или отрицательного заряда для усиления сходства с сегментом в интактном белке. Производное может иметь или не иметь точную первичную аминокислотную структуру пептида, раскрытого в настоящей заявке, при условии, что это производное остается функционально активным в отношении ингибирования MASP-2. Модификации могут включать замену аминокислоты одной из хорошо известных двадцати аминокислот или любой другой аминокислотой, дериватизированной или замещенной аминокислотой с дополнительными необходимыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментному расщеплению, или D-аминокислотой или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, который имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; делецию аминокислоты; вставку одной из двадцати хорошо известных аминокислот или любой другой аминокислоты, дериватизированной или замещенной

аминокислоты с дополнительными необходимыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментному расщеплению, или D-аминокислоты, или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, который имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод или мономер нуклеиновой кислоты, который имитирует природную конформацию, распределение зарядов и функцию родительского пептида. Пептиды также могут быть модифицированы путем ацетилирования или амидирования.

Синтез производных ингибирующих пептидов может быть основан на известных методах биосинтеза пептидов, биосинтеза углеводов и т.п. В качестве отправной точки специалист может использовать подходящую компьютерную программу для определения конформации представляющего интерес пептида. После определения конформации раскрытого в настоящем описании пептида специалист, используя методы моделирования, может определить тип замен, который необходим на том или ином участке для получения производного, у которого сохранена базовая конформация и распределение заряда, характерные для родительского пептида, но которое может иметь характеристики, отсутствующие у родительского пептида или улучшенные по сравнению с характеристиками родительского пептида. После идентификации производных молекул-кандидатов эти производные могут быть протестированы с помощью описанных в настоящем изобретении анализов для определения их способности функционировать в качестве ингибирующих MASP-2 агентов.

Скрининг MASP-2 ингибирующих пептидов.

Для получения и скрининга пептидов, которые имитируют молекулярную структуру ключевых участков связывания MASP-2 и подавляют MASP-2-зависимую активацию комплемента, можно использовать методы молекулярного моделирования и рационального молекулярного проектирования. Молекулярные структуры, используемые для моделирования, включают участки CDR анти-MASP-2 моноклональных антител, а также целевые области, известные своей важностью для функционирования MASP-2, включая участок, необходимый для димеризации, участок, вовлеченный в связывание MBL, и активный участок сериновой протеазы, как описано выше. Способы идентификации пептидов, которые связываются с конкретной мишенью, хорошо известны в данной области. Например, для *de novo* конструирования макромолекулярных структур, таких как пептиды, связывающиеся с конкретной молекулой, можно использовать молекулярный импринтинг. См., например, 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 иллюстрации ниже приведен пример одного из способов получения миметиков MASP-2-связывающих пептидов. Функциональные мономеры известного MASP-2-связывающего пептида или связывающего участка анти-MASP-2 антитела, которые подавляют активность MASP-2 (матрица) подвергают полимеризации. Затем матрицу удаляют, после чего следует полимеризация второго класса мономеров в том месте, откуда была удалена матрица, для создания новой молекулы, демонстрирующей одно и более требуемых свойств, аналогичных свойствам матрицы. Кроме получения пептидов, таким способом могут быть получены другие MASP-2-связывающие молекулы, которые являются ингибирующими MASP-2 агентами, такие как полисахариды, нуклеозиды, лекарственные вещества, нуклеопротеины, липопротеины, углеводы, гликопротеины, стероиды, липиды и другие биологически активные вещества. Данный способ можно использовать для создания большого многообразия биологических миметиков, которые являются более стабильными, чем их природные прототипы, так как они получены методом свободнорадикальной полимеризацией функциональных мономеров, образуя в результате соединение с каркасом, неподверженным биохимическому разложению.

Синтез пептидов.

Ингибирующие MASP-2 пептиды могут быть получены методами, хорошо известными в данной области, такими как метод твердофазного синтеза, впервые описанный Merrifield, J. *Amer. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963. С помощью аппарата 431A Peptide Synthesizer от Applied Biosystems (Foster City, Calif.) можно выполнять автоматизированный синтез в соответствии с инструкциями производителя. Другие методы описаны, например, у Bodanszky, M. et al., *Peptide Synthesis*, second edition, John Wiley & Sons, 1976, а также в других работах, известных специалистам в данной области техники.

Пептиды также могут быть получены стандартными методами генной инженерии, известными специалистам в данной области техники. Например, пептид может быть получен в результате ферментативного синтеза путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в вектор экспрессии, осуществляющий экспрессию ДНК и трансляцию этой ДНК в пептид в присутствии необходимых аминокислот. Затем пептид очищают с помощью хроматографии, или электрофореза, или белка-носителя, который может быть слит, а впоследствии отщеплен от пептида, путем встраивания в вектор экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-носитель, вместе с кодирующей пептид последовательностью. Слитый белок-пептид может быть выделен при помощи методов хроматографии, электрофореза или иммунологических методов (например, связывание белка-носителя со смолой посредством антитела). Пептид может быть отщеплен химическим методом или ферментативно, например, с помощью гидролазы.

Ингибирующие MASP-2 пептиды, используемые в способе по изобретению, также могут быть получены в рекомбинантных клетках-хозяевах при помощи обычных методов. Для экспрессии последова-

тельности, кодирующей ингибирующие MASP-2 пептиды молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид, должна быть функционально связана с регуляторными последовательностями, контролирующими транскрипционную экспрессию в векторе экспрессии, а затем внедрена в клетку-хозяина. Дополнительно к транскрипционным регулирующим последовательностям, таким как промоторы и энхансеры, векторы экспрессии могут включать трансляционные регуляторные последовательности и маркерный ген, которые являются подходящими для отбора клеток, несущих вектор экспрессии.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие ингибирующий MASP-2 пептид, могут быть синтезированы с помощью "генных машин" по протоколам, таким как, фосфорамидный метод. Если для приложения, такого как синтез гена или фрагмент гена, необходим химический синтез двухнитевой ДНК, то каждую комплементарную нить синтезируют отдельно. Получение коротких генов (от 60 до 80 пар оснований) не вызовет затруднений и может быть выполнен путем синтеза комплементарных нитей с последующим отжигом. Для получения более длинных генов синтетические гены (двухнитевые) собирают в модульную форму из одноцепочечных фрагментов длиной от 20 до 100 нуклеотидов. Обзор синтеза полинуклеотидов можно найти, например, у Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, 1994; Itakura, K. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 53:323, 1984; и Climie, S. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 87:633, 1990.

Низкомолекулярные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 агенты представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, включая природные и синтетические вещества, имеющие низкую молекулярную массу, такие как пептиды, пептидомиметики и непептидные ингибиторы (включая олигонуклеотиды и органические вещества). Низкомолекулярные ингибиторы MASP-2 могут быть получены на основе молекулярной структуры варьируемых участков анти-MASP-2 антител.

Низкомолекулярные ингибиторы также могут быть сконструированы и созданы на основе кристаллической структуры MASP-2 с помощью программ для компьютерного моделирования лекарственных веществ (Kuntz I.D. et al., *Science*, 257:1078, 1992). Описана кристаллическая структура крысиного MASP-2 (Feinberg, H. et al., *EMBO J.*, 22:2348-2359, 2003). Используя метод, описанный Kuntz et al., координаты кристаллической структуры MASP-2 вводят в компьютерную программу, такую как DOCK, которая на выходе выдает список низкомолекулярных структур, которые, как предполагается, связываются с MASP-2. Использование таких компьютерных программ хорошо известно специалисту в данной области техники. Например, кристаллическая структура ингибитора протеазы HIV-1 была использована для идентификации уникальных непептидных лигандов, которые являются ингибиторами протеазы HIV-1, путем оценки совместимости веществ из базы данных Cambridge Crystallographic со связывающим сайтом фермента с помощью программы DOCK (Kuntz, L.D. 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 компьютерных программ в качестве потенциальных ингибиторов MASP-2, подвергают скринингу в анализе связывания MASP-2, таком, как описано в примере 10. Те малые молекулы, которые, как было определено, связываются с MASP-2, затем оценивают в функциональном анализе, таком как описан в примере 2, для определения их способности подавлять MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Растворимые рецепторы MASP-2.

Считается, что другие подходящие ингибирующие MASP-2 агенты включают растворимые рецепторы MASP-2, которые могут быть получены методами, хорошо известными специалисту в данной области техники.

Ингибиторы экспрессии MASP-2.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения ингибирующий MASP-2 агент представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2, способный подавлять MASP-2-зависимую активацию комплемента. При практическом применении этого аспекта осуществления этого аспекта изобретения характерные ингибиторы экспрессии MASP-2 включают молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2 (такие как антисмысловая мРНК, антисмысловая ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды), рибозимы MASP-2 и молекулы РНКи MASP-2.

Антисмысловые молекулы РНК и ДНК напрямую блокируют трансляцию мРНК MASP-2 путем гибридизации с мРНК MASP-2, предотвращая трансляцию белка MASP-2. Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты может быть сконструирована различными способами, и она способна 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 обеспечивает транскрипцию его комплемента.

Обычно молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты является идентичной по меньшей мере части целевого гена или генов. Однако для подавления экспрессии целевого гена нуклеиновая кислота не обязательно должна быть абсолютно идентичной его нуклеотидной последовательности. Как правило, чем короче последовательность антисмысловой нуклеиновой кислоты, тем более высокую гомологию она должна иметь. Минимальный процент идентичности обычно составляет не менее примерно 65%, но

более высокий процент позволяет достигать более эффективного подавления экспрессии эндогенной последовательности. Процент идентичности, существенно превышающий примерно 80%, обычно является предпочтительным, хотя значения в интервале от примерно 95% до полной идентичности являются самыми предпочтительными.

Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты не обязательно должна иметь интрон или экзон такой же структуры, как у целевого гена; некодирующие сегменты целевого гена могут быть также эффективны в достижении антисмыслового подавления экспрессии целевого гена, как и кодирующие сегменты. В качестве молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты может быть использована последовательность ДНК из 8 или более нуклеотидов, хотя предпочтительной является более длинная последовательность. В настоящем изобретении типичным примером ингибирующего MASP-2 агента является молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2, которая по меньшей мере на 90% идентична комплементарной кДНК MASP-2, состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты, представленная в SEQ ID NO: 4, кодирует белок MASP-2, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

Нацеливание антисмысловых олигонуклеотидов на связывание с мРНК MASP-2 представляет собой другой механизм, который может быть использован для снижения уровня синтеза белка MASP-2. Например, синтез полигалактуроназы и ацетилхолинового мускаринового рецептора типа 2 подавляется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на соответствующие последовательности мРНК (патент США № 5739119, Cheng, и патент США № 5759829, Shewmaker). Кроме того, пример антисмыслового подавления был продемонстрирован для ядерного белка циклина, гена множественной лекарственной устойчивости (MDG1), ICAM-1, E-селектина, STK-1, стритарного рецептора ГАМК<sub>A</sub> и человеческого EGF (см., например, патент США 5801154, Baracchini; патент США 5789573, Baker; патент США 5718709, Considine; и патент США 5610288, Reubenstein).

Была описана система, позволяющая специалисту в данной области техники определять, какие олигонуклеотиды могут быть использованы для целей настоящего изобретения, которая включает зондирование подходящих сайтов в целевой мРНК путем расщепления РНКазой H в качестве индикатора доступности последовательностей в транскриптах. Scherr, M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 26:5079-5085, 1998; Lloyd et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:3665-3673, 2001. Смесь антисмысловых олигонуклеотидов, являющихся комплементарными по отношению к определенным участкам транскрипта MASP-2, добавляют в клеточные экстракты, экспрессирующие MASP-2, такие как гепатоциты, и осуществляют гибридизацию для создания сайтов, чувствительных к действию РНКазы H. Этот способ может быть объединен с выбором последовательностей при помощи компьютерной программы, которая может предсказать выбор оптимальных последовательностей для антисмысловых композиций на основе их относительной способности формировать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые могли бы снизить или предотвратить специфическое связывание с целевой мРНК в клетке-хозяине. Анализ этих вторичных структур и выбор целевых сайтов может быть выполнен с помощью компьютерной программы OLIGO для анализа праймеров (Rychlik, I., 1997) и компьютерной программы BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F. et al., *Nucl. Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997). Антисмысловые соединения, направленные на целевую последовательность, предпочтительно содержат от примерно 8 нуклеотидов до примерно 50 нуклеотидов. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие от примерно 9 нуклеотидов до примерно 35 нуклеотидов, являются особенно предпочтительными. Авторы изобретения рассматривают все олигонуклеотидные композиции в пределах от 9 до 35 нуклеотидов (т.е. имеющие в длину 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 нуклеотидов) как наиболее предпочтительные для способов по изобретению, основанных на применении антисмысловых олигонуклеотидов. Наиболее предпочтительными целевыми участками мРНК MASP-2 являются те, которые расположены в непосредственной близости от кодона инициации трансляции AUG, и последовательности, которые по существу комплементарны 5'-участкам 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 в SEQ ID NO: 4)       | Последовательность нуклеиновой кислоты кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующая CUBIEGF                                      |
| SEQ ID NO: 31<br>5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCCTCTGGGC3 | Нуклеотиды 12-45 последовательности SEQ ID NO: 4, включая сайт инициации трансляции MASP-2 (смысловой)                     |
| SEQ ID NO: 32<br>5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCAACGAGAAG3'  | Нуклеотиды 361-396 последовательности SEQ ID NO: 4, кодирующей участок, содержащий MBL-связывающий сайт MASP-2 (смысловой) |
| SEQ ID NO: 33<br>5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' | Нуклеотиды 610-642 последовательности SEQ ID NO: 4, кодирующей участок, который содержит домен CUBII                       |

Как указывалось выше, используемый в настоящем описании термин "олигонуклеотид" означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметики. Этот термин также охватывает такие олигонуклеобазы, которые состоят из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (остов) связей, а также олигонуклеотидов, имеющих не встречающиеся в природе модификации. Такие модификации позволяют вводить определенные нужные свойства, которыми не обладают природные олигонуклеотиды, такие как уменьшение токсических свойств, улучшение устойчивости к расщеплению нуклеазой и повышение клеточного захвата. В иллюстративных вариантах осуществления антисмысловые соединения по изобретению отличаются от нативной ДНК модификациями фосфодиэфирного остова, предназначенными для продления жизненного цикла антисмыслового олигонуклеотида, у которого фосфатные заместители заменены фосфоротиоатами. Подобным образом, один либо оба конца олигонуклеотида могут быть замещены одним или более акридиновыми производными, которые интеркалируют между соседними парами нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты.

Другой альтернативой использования антисмысловых элементов является использование "РНК интерференции" (РНКи). Двухцепочечные РНК (дцРНК) могут провоцировать сайленсинг генов у млекопитающих *in vivo*. Природная функция РНКи и косупрессия, по-видимому, являются защитой генома от инвазии мобильных генетических элементов, таких как ретротранспозоны и вирусы, продуцирующие aberrантные РНК или дцРНК в клетке-хозяине при их активации (см., например, Jensen, J. et al., Nat. Genet., 21:209-12, 1999). Молекула двухцепочечной РНК может быть получена в процессе синтеза двух цепей РНК, способных формировать молекулы двухцепочечной РНК, каждая из которых имеет длину от примерно 19 до 25 (например, 19-23 нуклеотидов). Например, молекула дцРНК, используемая в способах по изобретению, может содержать РНК, соответствующую последовательности и ее комплементу, приведенным в табл. 4. Предпочтительно по меньшей мере одна цепь РНК имеет 3' "липкий" конец из 1-5 нуклеотидов. Синтезированные цепи РНК комбинируют в условиях, при которых образуется двухцепочечная молекула. Последовательность РНК может содержать по меньшей мере части из 8 нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 4 с общей длиной 25 нуклеотидов или менее. Конструирование последовательностей миРНК для заданной мишени хорошо известно специалисту в данной области техники. Существуют коммерческие организации, занимающиеся конструированием последовательностей миРНК, гарантирующие по меньшей мере 70% нокдаун экспрессии (Qiagen, Valencia, Calif).

дцРНК может быть введена в форме фармацевтической композиции известными способами, при помощи которых нуклеиновую кислоту вводят в требуемую клетку-мишень. Общеизвестные способы переноса генов включают фосфат кальциевый способ, DEAE-декстрановый способ, электропорацию, микроинъекцию и способы с использованием вирусов. Такие способы описаны у Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Для уменьшения количества и/или биологической активности MASP-2 также могут быть использованы рибозимы, такие как рибозимы, нацеленные на мРНК MASP-2. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, способные расщеплять молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, полностью или частично гомологичной последовательности рибозима. Существует возможность конструирования рибозимных трансгенов, кодирующих рибозимы РНК, которые образуют специфические пары с целевой РНК и расщепляют фосфодиэфирный остов в специфическом участке, вследствие чего происходит функциональная инактивация целевой РНК. При осуществлении такого расщепления сам рибозим не меняется и, таким образом, способен к рециклингу и расщеплению других молекул. Включение рибозимных последовательностей в антисмысловые РНК обуславливает активность расщеп-

ления РНК, таким образом увеличивая активность антисмысловых конструкций.

Рибозимы, используемые в изобретении, обычно содержат гибридирующий участок из по меньшей мере девяти нуклеотидов, который является комплементарным нуклеотидной последовательности по меньшей мере части целевой мРНК MASP-2, и каталитическую область, которая способна к расщеплению целевой мРНК (см. EPA № 0321201; WO 88/04300; Haseloff, J. et al., *Nature*, 334:585-591, 1988; Fedor, M.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R. et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 55:599-629, 1986).

Рибозимы могут либо быть нацелены непосредственно на клетки в форме олигонуклеотидов РНК, включающих рибозимные последовательности, либо быть введены в клетку в качестве вектора экспрессии, кодирующего требуемую рибозимную РНК. Рибозимы можно использовать и применять практически так же, как описано для антисмысловых полинуклеотидов.

Антисмысловые РНК и ДНК, рибозимы и молекулы РНКи, используемые в способах по изобретению, могут быть получены любым методом, известным в данной области для синтеза молекул ДНК и РНК. Они включают методы химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, широко известные в области техники, такие как, твердофазный фосфорамидный химический синтез. Альтернативно молекулы РНК могут быть получены с помощью *in vitro* и *in vivo* транскрипции последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антисмысловой РНК. Такие последовательности ДНК могут быть введены в широкий спектр векторов, которые включают подходящие промоторы РНК полимеразы, такие как T7 или SP6 промоторы полимеразы. Альтернативно конструкции антисмысловой кДНК, синтезирующие антисмысловую РНК конститутивно или индуцибельно, в зависимости от используемого промотора, могут стабильно вводиться в клеточные линии.

Различные хорошо известные модификации молекул ДНК могут быть введены для повышения стабильности и периода полувыведения. Пригодные модификации включают без ограничения добавление фланкирующих последовательностей рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов к 5'- и/или 3'-концам молекулы или использование фосфоротиоата или 2'-О-метила вместо фосфодиэфирных связей внутри олигодезоксирибонуклеотидного каркаса.

V. Фармацевтические композиции и способы доставки.

Дозирование.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставляются композиции для подавления побочных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, как раскрыто в настоящем описании, содержащие терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 агента и фармацевтически приемлемый носитель. Ингибирующие MASP-2 агенты могут вводиться нуждающемуся в этом субъекту в терапевтически эффективных дозах для лечения или улучшения состояний, ассоциированных MASP-2-зависимой активацией комплемента. Под терапевтически эффективной дозой подразумевается количество ингибирующего MASP-2 агента, достаточное для облегчения симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

Токсичность и терапевтическая эффективность ингибирующих MASP-2 агентов может быть определена стандартными фармацевтическими процедурами с использованием экспериментальных животных моделей, таких как MASP-2-/- мышьяная модель, экспрессирующая человеческий трансген MASP-2, описанный в примере 1. Используя такие животные модели, значения NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) и MED (минимальная эффективная доза) могут быть определены стандартными способами. Отношение дозы между эффектами NOAEL и MED является терапевтическим отношением, которое выражается как NOAEL/MED отношение. Ингибирующие MASP-2 агенты, демонстрирующие высокие терапевтические отношения или показатели, являются наиболее предпочтительными. Данные, полученные в результате изучения клеточных культур и животных, могут быть использованы для определения диапазона доз для человека. Дозы ингибирующего MASP-2 агента предпочтительно находятся в диапазоне концентраций, наблюдаемых в кровотоке, которые включают MED с минимальной токсичностью или без нее. Доза может варьировать внутри этого диапазона в зависимости от лекарственной формы или используемого способа введения.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая эффективность ингибирующих MASP-2 агентов для лечения, подавления, облегчения или профилактики фиброза у млекопитающего, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, определяют с помощью одного или более из следующего:

уменьшения в почечной ткани одного или более маркеров воспаления или рубцевания (например, TGFβ-1, CTFF, IL-6, апоптоза, фибронектина, ламинина, коллагенов, ЕМТ, инфильтрующих макрофагов);

уменьшения уровня высвобождения в мочу или плазму растворимых маркеров воспаления и фиброзного почечного заболевания (например путем измерения почечной экскреторной функции).

Для состава любого соединения, терапевтически эффективную дозу можно оценить с помощью животных моделей. Например, доза может быть подобрана на животной модели таким образом, чтобы достигался диапазон концентраций, циркулирующих в плазме, который включает MED. Количественные уровни ингибирующего MASP-2 агента в плазме также могут быть измерены, например, с помощью вы-



сокоэффективной жидкостной хроматографии.

Помимо изучения токсичности, эффективную дозу также можно оценить по количеству MASP-2 белка у живого субъекта и средства связывания ингибирующего MASP-2 агента. Было показано, что уровни MASP-2 у здоровых людей в сыворотке являются низкими, в пределах 500 нг/мл, при этом уровни MASP-2 у конкретного субъекта могут быть определены методами количественного анализа MASP-2, как описано у Moller-Kristensen M. et al., *J. Immunol. Methods*, 282:159-167, 2003.

Обычно доза вводимых композиций, содержащих ингибирующие MASP-2 агенты, варьирует в зависимости от таких факторов, как возраст субъекта, его массу тела, рост, пол, общее состояние здоровья и история болезни. В качестве иллюстрации, ингибирующие MASP-2 агенты, такие как анти-MASP-2 антитела, могут вводиться в пределах дозы от примерно 0,010 до 10,0 мг/кг, предпочтительно, 0,010 до 1,0 мг/кг, более предпочтительно 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит комбинацию анти-MASP-2 антител и ингибирующих MASP-2 пептидов.

Терапевтическая эффективность ингибирующих MASP-2 композиций и способов по изобретению для данного субъекта, а также подходящие дозы могут быть определены с помощью анализа реакций комплемента, хорошо известных специалисту в данной области техники. Комплемент генерирует многочисленные специфические продукты. За последние десять лет были разработаны точные и специфические анализы, которые являются коммерчески доступными для большинства из таких продуктов активации, включая малые фрагменты активации C3a, C4a и C5a и большие фрагменты активации iC3b, C4d, Bb и sC5b-9. В большинстве этих анализов используются моноклональные антитела, которые реагируют на новые антигены (неоантигены), расположенные на этих фрагментах, но не на нативные белки, из которых они образовались, что делает эти анализы весьма доступными и специфическими. В большинстве случаев используют метод ИФА, хотя для C3a и C5a до сих пор все еще иногда используется радиоиммунологический анализ. Последний анализ используется для измерения уровня как непротессируемых фрагментов, так и их 'desArg' фрагментов, которые являются основными формами, обнаруживаемыми в кровяном русле. Непротессируемые фрагменты и C5a<sub>desArg</sub> быстро выводятся через связывание с рецепторами клеточной поверхности и, следовательно, присутствуют в очень низких концентрациях, тогда как C3a<sub>desArg</sub> не связывается с клетками и накапливается в плазме. Измерение C3a является чувствительным, независимым индикатором активации комплемента. Альтернативный путь активации комплемента может быть определен путем измерения фрагмента Bb. Обнаружение растворимых продуктов активации мембраноатакующего пути, sC5b-9, является свидетельством того, что комплемент полностью активирован. Так как оба, лектиновый и классический, пути активации генерируют одни и те же продукты активации, C4a и C4d, измерение этих двух фрагментов не дает никакой информации о том, какой из этих двух путей активации комплемента сгенерировал продукты активации.

Подавление MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компоненте системы комплемента, которые возникают в результате введения ингибирующего MASP-2 агента в соответствии со способами по изобретению: подавление генерации или продуцирования продуктов системы MASP-2-зависимой активации комплемента: C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (измеренные, например, как описано в примере 2), уменьшение уровня расщепления C4 и отложения C4b (измеренное, например, как описано в примере 10) или уменьшение уровня расщепления C3 и отложения C3b (измеренное, например, как описано в примере 10).

Дополнительные агенты.

В некоторых вариантах осуществления способы профилактики, лечения, купирования и/или подавления фиброза и или воспаления включают введение подавляющего MASP-2 агента (например, ингибирующего MASP-2 антитела) в рамках терапевтической схемы с одним или более другими лекарственными веществами, биологическими веществами или терапевтическими методами лечения, подходящими для подавления фиброза и/или воспаления. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное, биологическое вещество или терапевтический метод лечения является подходящим для конкретных симптомов, ассоциированных с заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением. В качестве примера ингибирующие MASP-2 антитела можно вводить как часть терапевтической схемы вместе с одним или более иммунодепрессантами, такими как метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн и микофенолат-мофетил. В качестве другого примера ингибирующие MASP-2 антитела можно вводить как часть терапевтической схемы вместе с одним или более агентами, предназначенными для усиления кровотока (например, нифедипин, амлодипин, дилтиазем, фелодипин или никардипин). В качестве другого примера ингибирующие MASP-2 антитела можно вводить как часть терапевтической схемы вместе с одним или более агентами, предназначенными для уменьшения фиброза, такими как d-пеницилламин, колхицин, PUVA, релаксин, циклоспорин, TGF бета-блокаторы и/или p38 MAPK блокаторы. В качестве дополнительного примера, ингибирующие MASP-2 антитела можно вводить как часть терапевтической схемы вместе со стероидами или бронхорасширителями.

Композиции и способы, использующие ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) необязательно могут включать один или более дополнительных терапевтических

агентов, которые способны усиливать активность ингибирующего MASP-2 агента или которые обеспечивают родственные терапевтические функции, обеспечивая дополнительный или синергетический эффект. Например, в контексте лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, один или более ингибирующих агентов MASP-2 можно вводить в комбинации (включая совместное введение) с одним или более дополнительными антифиброзными агентами и/или одним или более противовоспалительными агентами и/или иммунодепрессантами.

Ингибирующие MASP-2 агенты (например, ингибирующие MASP-2 антитела) можно применять в комбинации с другими терапевтическими агентами, такими как иммунодепрессанты общего действия, такие как кортикостероиды, иммунодепрессанты или цитотоксические агенты и/или антифиброзные агенты.

**Фармацевтические носители и средства доставки.**

Как правило, композиции ингибирующих MASP-2 агентов по настоящему изобретению, объединенные с любым другим выбранным терапевтическим агентом, содержатся в подходящем фармацевтически приемлемом носителе. Носитель является нетоксичным, биосовместимым и выбирается так, чтобы можно было избежать вредное воздействие биологической активности ингибирующего MASP-2 агента (и любого другого терапевтического агента, включенного в комбинацию). Типичные фармацевтически приемлемые носители для пептидов описаны в патенте США 5211657, Yamada. Анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды, используемые в настоящем изобретении, могут быть составлены в твердую, полутвердую, гелеобразную, жидкую и газообразную лекарственную форму, такую как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депозитории, ингаляции и инъекции для перорального, парентерального или хирургического введения. Настоящее изобретение также предусматривает местное введение композиций путем нанесения покрытия на медицинские инструменты и т.п.

Подходящими носителями для парентерального введения путем инъекции, инфузии или орошения и местной доставки являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера, нормальный или с лактатом, раствор Д-глюкозы, раствор Хэнка или пропандиол. Кроме того, стерильные, нелетучие масла могут применяться в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое биосовместимое масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, может применяться для приготовления пригодных для инъекции препаратов. Носитель и агент могут быть смешаны в виде жидких растворов, суспензий, способных или не способных к полимеризации гелей, паст или бальзамов.

Носители также могут содержать средство доставки для замедления (т.е. пролонгирования, задержки или контроля) доставки агента(ов) или для усиления доставки, поглощения, стабилизации или фармакокинетических параметров терапевтического агента(ов). Такое средство доставки может включать без ограничения микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических веществ, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие системы доставки на основе гидрогелей и мицелл включают сополимеры PEO:PHB:PEO и сополимерные/циклодекстриновые комплексы, описанные в WO 2004/009664 A2, и PEO и PEO/циклодекстриновые комплексы, описанные в публикации заявки на патент США 2002/0019369 A1. Такие гидрогели могут быть введены путем местных инъекций в область предполагаемого воздействия или подкожно, или внутримышечно для обеспечения замедленного высвобождения агента.

В случае внутрисуставной доставки ингибирующий MASP-2 агент может быть доставлен в вышеописанных предназначенных для инъекций жидких или гелевых носителях, вышеописанных предназначенных для инъекций средствах доставки, обеспечивающих замедленное высвобождение, или носителях на основе гиалуроновой кислоты или ее производных.

В случае перорального введения непептидергических агентов ингибирующий MASP-2 агент может быть доставлен в инертных наполнителях или растворителях, таких как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза.

В случае местного введения ингибирующий MASP-2 агент может быть доставлен в составе мази, лосьона, крема, геля, капель, суппозитория, спрея, жидкости или порошка, или в гелевых или микрокапсульных системах доставки при помощи трансдермального пластыря.

Различные назальные и легочные системы доставки, включая аэрозоли, дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка и распылители, находятся на стадии разработки и могут соответствующим образом быть адаптированы для доставки препарата по настоящему изобретению с помощью аэрозоля, ингалятора или средства доставки в виде распылителя, соответственно.

В случае интратекальной (IT) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставки могут быть использованы соответствующие стерильные системы доставки (например, жидкости, гели, суспензии и т.д.).

Композиции по настоящему изобретению также могут включать биосовместимые наполнители, такие как диспергирующие или увлажняющие агенты, суспендирующие агенты, растворители, буферы, агенты, усиливающие проникновение, эмульгаторы, связующие средства, загустители, ароматизирую-

щие вещества (для перорального введения).

Фармацевтические носители для антител и пептидов.

Более конкретно, касательно анти-MASP-2 антител и ингибирующих пептидов, приведенные в качестве примера составы могут вводиться парентерально в виде дозированных инъекций раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом растворителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масло, физиологический раствор, глицерин или этанол. В композициях, содержащих анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды, дополнительно могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества, регулирующие pH вещества и т.п. Дополнительные компоненты фармацевтических композиций включают углеводородную смесь (такую как животного, растительного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. Для растворов, вводимых путем инъекций предпочтительными жидкими носителями, как правило, являются гликоли, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль.

Анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды также могут вводиться в форме инъекций веществ замедленного всасывания или имплантируемого препарата, который может быть составлен с возможностью замедленного или пульсирующего высвобождения активных агентов.

Фармацевтически приемлемые носители для ингибиторов экспрессии.

Что касается ингибиторов экспрессии, используемых в способах по изобретению, предоставляются композиции, содержащие ингибитор экспрессии, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель. Композиции могут дополнительно содержать коллоидную дисперсионную систему.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибиторы экспрессии, могут включать, без исключения, составы, содержащие растворы, эмульсии и липосомы. Такие композиции могут быть получены из различных компонентов, включающих без ограничения заранее приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Приготовление таких композиций обычно включает комбинирование ингибитора экспрессии с одним или более из следующего: буферы, антиоксиданты, низкомолекулярные полипептиды, белки, аминокислоты, углеводы, включая глюкозу, сахарозу или декстрин, хелатирующие агенты, такие как EDTA, глутатион и другие стабилизаторы и наполнители. Нейтральные забуференные физиологические растворы или физиологические растворы, смешанные с неспецифическим сывороточным альбумином являются примерами соответствующих растворителей.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть приготовлены и составлены в виде эмульсий, которые обычно являются гетерогенными системами одного жидкого вещества, диспергированного в другом в виде микрокапель (см. Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Примерами природных эмульгирующих агентов, используемых для составов в виде эмульсий, являются гуммиарабик, пчелиный воск, ланолин, лецитин и фосфатиды.

В одном из вариантов осуществления композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, могут быть составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсии, как указано в настоящем описании, представляет собой систему из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически однородный и термодинамически стабильный жидкий состав (см. Rosoff в *Pharmaceutical Dosage Forms*, vol. 1). Способ по изобретению также может включать использование липосом для переноса и доставки антисмысловых олигонуклеотидов в нужный участок.

Фармацевтические композиции и составы ингибиторов экспрессии для топического нанесения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Также могут быть использованы традиционные фармацевтические носители, например, на основе воды, порошков или масел, загустители и т.п.

Способы введения.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 агенты, могут быть введены различными способами, в зависимости от того, какой из способов введения, местный или системный, является более подходящим для подлежащего лечению заболевания. Далее, композиции по настоящему изобретению могут быть доставлены путем покрытия или включения композиций в поверхность имплантируемого медицинского устройства или в само это устройство.

Системная доставка.

В соответствии с настоящим описанием, термины "системная доставка" или "системное введение" включают без ограничения пероральный и парентеральный способы введения, включая внутримышечный (IM), подкожный, внутривенный (IV), внутриартериальный, ингаляционный, подязычный, буккальный, топическое нанесение, трансдермальный, назальный, ректальный, вагинальный и другие способы введения, которые обеспечивают эффективное диспергирование доставленного агента в одном или многочисленных участках предполагаемого терапевтического воздействия. Предпочтительные способы системной доставки настоящих композиций включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и ингаляционный. Будет понятно, что точный способ системного введения выбранных агентов, используемых в конкретных композициях по настоящему изобретению, может быть определен с учетом подвер-

женности этого агента к метаболической трансформации способом, ассоциированным с данным способом введения. Например, самым подходящим способом введения пептидергических агентов является любой, кроме перорального.

Антитела и полипептиды, ингибирующие MASP-2, могут быть доставлены нуждающемуся в этом субъекту любым подходящим способом. Способы доставки антител и полипептидов MASP-2 включают пероральное, пульмональное, парентеральное введение (например, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные (IV) или подкожные инъекции), ингаляцию (например, тонкоизмельченного порошка), трансдермальное, назальное, вагинальное, ректальное или подкожное введение, и могут быть приготовлены в лекарственных формах, подходящих для каждого из способов введения.

В качестве иллюстративного примера, антитела и пептиды, ингибирующие MASP-2, могут быть введены в живой организм путем нанесения на слизистую оболочку, обладающую способностью абсорбировать полипептиды, например, слизистую носа, желудочно-кишечного тракта и прямой кишки. Полипептиды обычно наносят на абсорбирующую слизистую оболочку в сочетании с агентом, усиливающим проницаемость (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 представляет собой синтетическое производное фусидовой кислоты, стероидного поверхностно-активного вещества, которое по своей структуре аналогично солям желчных кислот и которое используется в качестве агента, усиливающего проницаемость при назальной доставке. (Lee, W.A., *Biopharm.*, 22, Nov./Dec. 1990.)

Антитела и полипептиды, ингибирующие MASP-2, могут быть введены в комбинации с другой молекулой, например, липидом, для защиты полипептидов от ферментной деградации. Например, ковалентное прикрепление полимеров, в частности полиэтиленгликоля (PEG), использовали для защиты некоторых белков от ферментного гидролиза в организме, и, таким образом, продлевали период их полувыведения (Fuertges, F. et al., *J. Controlled Release*, 11:139, 1990). Описаны многие полимерные системы для доставки белков (Bae, Y.H. et al., *J. Controlled Release*, 9:271, 1989; Hori, R. et al., *Pharm. Res.*, 6:813, 1989; Yamakawa, I. et al., *J. Pharm. Sci.*, 79:505, 1990; Yoshihiro, I. et al., *J. Controlled Release*, 10:195, 1989; Asano, M. et al., *J. Controlled Release*, 9:111, 1989; Rosenblatt, J. et al., *J. Controlled Release*, 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release*, 12:235, 1990; Takakura, Y et al., *J. Pharm. Sci.*, 78:117, 1989; Takakura, Y. et al., *J. Pharm. Sci.*, 78:219, 1989).

Недавно были разработаны липосомы с повышенной стабильностью в сыворотке и увеличенным периодом полувыведения (см., например, патент США 5741516, Webb). Кроме того, были рассмотрены различные способы производства липосом и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных веществ (см., например, патент США 5567434, Szoka; патент США 5552157, Yagi; патент США 5565213, Nakamori; патент США 5738868, Shinkarenko; и патент США 5795587, Gao).

Для трансдермального нанесения антитела и полипептиды, ингибирующие MASP-2, могут быть объединены с другими подходящими ингредиентами, такими как, носители и/или адъюванты. Такие ингредиенты, используются независимо от их природы, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми для предполагаемого введения и не должны уменьшать воздействие активных ингредиентов композиции. Примеры подходящих основ включают кремы, мази, гели или суспензии, содержащие или не содержащие очищенный коллаген. Антитела и полипептиды, ингибирующие MASP-2, также могут быть импрегнированы в трансдермальные пластыри, повязки и биндажи, предпочтительно в жидкой или полужидкой форме.

Композиции по настоящему изобретению могут вводиться системно через определенные промежутки времени, необходимые для поддержания требуемого уровня терапевтического эффекта. Например, составы могут вводиться путем подкожных инъекций каждые две-четыре недели или через менее частые промежутки времени. Схема дозирования определяется лечащим врачом с учетом различных факторов, которые могут оказывать влияние на действие комбинации агентов. Эти факторы включают степень прогрессирования подлежащего лечению заболевания, возраст пациента, его пол и массу тела и другие клинические факторы. Доза каждого отдельного агента будет меняться в зависимости от функции ингибирующего MASP-2 агента, включенного в композицию, а также от наличия и природы любого средства для доставки лекарственного вещества (например, средства для доставки с замедленным высвобождением). Кроме того, дозировку можно корректировать с учетом частоты введения и фармакокинетического поведения доставляемого агента(ов).

#### Местная доставка.

Используемый в настоящем описании термин "местное" охватывает нанесение препарата на или вокруг области предполагаемого местного воздействия и может включать, например, топическую доставку на кожу или другую пораженную ткань, офтальмологическую доставку, интратекальное (IT), интрацеребровентрикулярное (ICV), внутрисуставное, внутриполостное, внутричерепное или внутрипупырьное введение, размещение или орошение. Местное введение может быть более предпочтительным с точки зрения введения более низких доз, предотвращения возникновения системных побочных эффектов и для более точного контроля времени доставки и концентрации активных агентов в участке местной доставки. Местное введение предусматривает известные концентрации в целевой области, независимо от

индивидуальных различий между пациентами с точки зрения метаболизма, кровообращения и т.д. Улучшенный контроль дозирования также обеспечивается прямой доставкой.

Местная доставка ингибирующего MASP-2 агента может быть достигнута в контексте хирургических методов лечения заболеваний или расстройств, вызванных или осложненных фиброзом и/или воспалением, например, во время процедур, таких как операция.

#### Схемы лечения.

В профилактических целях фармацевтические композиции, содержащие ингибирующий MASP-2 агент (например ингибирующее MASP-2 антитело), вводят субъекту, подверженному или имеющему риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, в количестве, достаточном для подавления фиброза и/или воспаления, таким образом устраняя или уменьшая риск развития симптомов этого состояния. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят субъекту с подозрением на наличие заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, или уже страдающему таким заболеванием или расстройством, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения симптоматики этого состояния. Как в профилактических, так и в терапевтических целях, композиции, содержащие ингибирующий MASP-2 агент, могут вводиться несколькими дозами до достижения достаточного терапевтического результата. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению может осуществляться путем однократного введения композиции или ограниченной серии введений для лечения острого состояния, ассоциированного с фиброзом и/или воспалением. Альтернативно композиция может вводиться через определенные промежутки времени в течение продолжительного времени для лечения хронического состояния, ассоциированного с фиброзом и/или воспалением.

Как в профилактических, так и в терапевтических целях композиции, содержащие ингибирующий MASP-2 агент, могут вводиться несколькими дозами до достижения достаточного терапевтического результата. В одном из вариантов осуществления ингибирующий MASP-2 агент содержит ингибирующее MASP-2 антитело, которое предпочтительно может быть введено взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе в пределах от 0,1 до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 до 1000 мг и еще более предпочтительно от 50,0 до 500 мг. Для пациентов детского возраста, дозу можно корректировать пропорционально массе тела пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению может осуществляться путем однократного введения композиции или ограниченной серии введений для лечения субъекта, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением. Альтернативно композицию можно вводить через определенные промежутки времени, например, ежедневно, два раза в неделю, раз в неделю, через неделю, раз в месяц, два раза в месяц в течение продолжительного времени для лечения субъекта, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением.

Как в профилактических, так и в терапевтических целях композиции, содержащие ингибирующий MASP-2 агент, могут вводиться несколькими дозами до достижения достаточного терапевтического результата.

В некоторых вариантах осуществления субъекта идентифицируют как имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом или воспалением, путем определения наличия у субъекта одного или более симптомов нарушения функции почек, оцененных, например, путем измерения уровня креатинина в сыворотке, скорости выведения креатинина из сыворотки, уровня азота в моче, белка в моче, и/или путем измерения одного или более биомаркеров, ассоциированных с заболеванием или поражением почек.

Способы оценки функции почек хорошо известны в данной области и включают без ограничения измерения системного кровяного давления и гломерулярного капиллярного давления, протеинурии (например, альбуминурии), микроскопической и макроскопической гематурии, уровня креатинина в сыворотке (например, согласно одной из формул оценки функции почек у людей, уровень креатинина, равный 2,0 мг/дл, соответствует 50% нормальной функции почек, а 4,0 мг/дл - 25%), снижение скорости клубочковой фильтрации (например, скорости клиренса креатинина) и степень канальцевого повреждения. Например, оценка функции почек может включать оценку по меньшей мере одной функции почек с использованием биологических и/или физиологических параметров, таких как уровень креатинина в сыворотке крови, скорость клиренса креатинина, секрецию белка за 24 ч, скорость клубочковой фильтрации, соотношение креатинина и альбумина в моче, скорость выведения альбумина (например, определенные степени фиброза почек путем измерения отложения коллагена и/или фибронектина).

#### VI. Примеры.

Приведенные ниже примеры являются только иллюстрацией наилучшего способа практической реализации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение. Все упомянутые в настоящей заявке литературные источники включены в настоящее описание в виде ссылки.

## Пример 1.

В этом примере описано получение мышинной линии, дефицитной по MASP-2 (MASP-2<sup>-/-</sup>), но полноценной по MAp19 (MAp19<sup>+/+</sup>).

Материалы и методы. Целевой вектор pKO-NTKV 1901 создавали для разрушения трех экзонов, кодирующих С-терминальный конец мышинного MASP-2, включая экзон, который кодирует домен сериновой протеазы, как показано на фиг. 3. pKO-NTKV 1901 использовали для трансфекции мышинной ES клеточной линии E14.1a (SV129 Ola). Отбирали клоны, устойчивые к неомицину и чувствительные к тимидинкиназе. 600 ES-клонов подвергали скринингу и из них с помощью саузерн-блот анализа идентифицировали и верифицировали четыре разных клон, содержащих требуемые селективные целевые и рекомбинантные события, как показано на фиг. 3. Путем переноса эмбриона из этих четырех положительных клонов получали химеры. Затем химеры подвергли обратному скрещиванию с фоновым фенотипом C57/BL6 с получением трансгенных особей мужского пола. Затем трансгенных особей мужского пола скрещивали с женскими с получением F1 с 50% потомства, проявляющего гетерозиготность по нарушенному гену MASP-2. Гетерозиготных мышей скрещивали между собой с получением гомозиготного потомства, дефицитного по MASP-2, с полученным соотношением между гетерозиготными мышами и мышами дикого типа 1:2:1 соответственно.

Результаты и фенотип. Полученных в результате гомозиготных MASP-2<sup>-/-</sup> дефицитных мышей, которые оказались жизнеспособными и фертильными, проверяли на дефицит по MASP-2 с помощью саузерн-блот анализа для подтверждения корректного целевого события, с помощью нозерн-блот анализа для подтверждения отсутствия мРНК MASP-2 и с помощью вестерн-блот анализа для подтверждения отсутствия белка MASP-2 (данные не показаны). Наличие мРНК MAp19 и отсутствие мРНК MASP-2 далее подтверждали методом ПЦР-РВ с разрешением по времени на устройстве LightCycler. Как и ожидалось, у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей продолжалась экспрессия мРНК и белков MAp19, MASP-1 и MASP-3 (данные не показаны). MASP-2<sup>-/-</sup>-мышей анализировали на наличие и чрезмерное количество мРНК пропердина, фактора В, фактора D, C4, C2 и C3 с помощью LightCycler анализа, и было найдено, что они идентичны уровням, имеющимся у контрольных однопометных животных дикого типа (данные не показаны). Плазма гомозиготных MASP-2<sup>-/-</sup> мышей была полностью дефицитной в отношении активации комплемента, опосредованной лектиновым путем, как описано ниже в примере 2.

Генерация MASP-2<sup>-/-</sup> линии на чистом фоновом генотипе C57BL6. MASP-2<sup>-/-</sup> мышей подвергали обратному скрещиванию с чистой линией C57BL6 в течение девяти генераций до использования MASP-2<sup>-/-</sup> линии в качестве экспериментальной животной модели.

Трансгенную мышиную линию, которая представляет собой мышиную MASP-2<sup>-/-</sup>, MAp19<sup>+/+</sup> линию и которая экспрессирует человеческий MASP-2-трансген (мышинный MASP-2 нокаут и человеческий MASP-2-нокин), получали следующим образом:

Материалы и методы. Создавали миниген, кодирующий человеческий MASP-2, названный "мини-hMASP-2" (SEQ ID NO: 49), как показано на фиг. 4, который включает промоторную область гена человеческого MASP-2, включая три первых экзона (экзон 1 -экзон 3), за которой следует последовательность кДНК, которая является кодирующей последовательностью из 8-ми последовательно расположенных экзонов, обеспечивая кодирование полноразмерного белка MASP-2, запускаемое эндогенным промотором. Конструкцию мини-hMASP-2 вводили в оплодотворенные яйца MASP-2<sup>-/-</sup>, чтобы заменить дефицитный мышинный MASP-2 ген трансгенно экспрессируемым человеческим MASP-2.

## Пример 2.

В этом примере показано, что MASP-2 требуется для активации комплемента через лектиновый путь.

## Материалы и методы.

Анализ расщепления C4, специфического для лектинового пути. Анализ расщепления C4 описан у Petersen et al., J. Immunol. Methods, 257:107 (2001), в котором измеряли активацию лектинового пути, инициированную липотейхоевой кислотой (LTA) от *S. aureus*, которая связывается с L-фиколином. Анализ, описанный Petersen et al., (2001), адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством MBL путем нанесения на планшет ЛПС и маннан или зимозан перед добавлением сыворотки, полученной от MASP-2<sup>-/-</sup>-мышей, как описано ниже. Анализ также модифицировали для исключения возможности расщепления C4 по классическому пути. Это достигалось путем использования буфера для разбавления образца, содержащего 1M NaCl, который обеспечивал высокое сродство связывания компонентов узнавания лектинового пути со своими лигандами, но предотвращал активацию эндогенного C4, таким образом, исключая участие классического пути в результате диссоциации комплекса C1. Вкратце в модифицированном анализе образцы сыворотки (разбавленные буфером с высоким содержанием соли (1M NaCl)) добавляли в планшеты, покрытые лигандом, с последующим добавлением постоянного количества очищенного C4 в буфере с физиологической концентрацией соли. Связанные комплексы узнавания, содержащие MASP-2, расщепляют C4, приводя к отложению C4b.

## Способы анализа.

1) Титрационные микропланшеты Nunc Maxisorb (MaxiSorb®, Nunc, кат. № 442404, Fisher Scientific) покрывали 1 мкг/мл маннаном (M7504 Sigma) или любым другим лигандом (таким как, пере-

численные ниже), разбавленным в буфере для нанесения покрытия (15 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6).

В анализе использовали следующие реагенты:

- а) маннан (1 мкг на лунку маннана (M7504 Sigma) в 100 мкл буфера для нанесения покрытия);
- б) зимозан (1 мкг на лунку зимозана (Sigma) в 100 мкл буфера для нанесения покрытия);
- с) LTA (1 мкг на лунку в 100 мкл буфера для нанесения покрытия или 2 мкг на лунку в 20 мкл метанола);
- д) 1 мкг Н-фиколин-специфического Mab 4H5 в буфере для нанесения покрытия;
- е) PSA от *Aerococcus viridans* (2 мкг на лунку в 100 мкл буфера для нанесения покрытия);
- ф) 100 мкл на лунку *S. aureus* DSM20233, фиксированного в формалине ( $\text{OD}_{550}=0,5$ ), в буфере для нанесения покрытия.

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

3) После ночной инкубации оставшиеся участки связывания белка насыщали путем инкубации планшетов с 0,1% HSA-TBS блокирующим буфером (0,1% (в/о) HSA в 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, 1,5 мМ  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4) в течение 1-3 ч и затем планшеты промывали три раза смесью TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$  (TBS с 0,05% Твин 20 и 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4).

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

5) После ночной инкубации при 4°C, планшеты трижды промывали смесью TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$ . Затем в планшет добавляли человеческий C4 (1 мкг/мл разбавленного в BBS (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4) по 100 мкл на лунку) и инкубировали в течение 90 мин при 37°C. Затем планшеты снова трижды промывали смесью TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$ .

6) Отложение C4b определяли с помощью конъюгированного с щелочной фосфатазой куриного античеловеческого C4с (разведенного в соотношении 1:1000 в TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$ ), которое добавляли в планшеты, и инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем планшеты снова трижды промывали смесью TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$ .

7) Щелочную фосфатазу детектировали путем добавления 100 мкл раствора п-нитрофенилфосфатного субстрата, инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин и считывания оптической плотности  $\text{OD}_{405}$  на устройстве считывания титрационных микропланшетов.

Результаты.

На фиг. 5A, 5B показано отложение C4b на маннane (фиг. 5A) и зимозане (фиг. 5B) в разбавленных сыворотках, полученных от MASP-2+/+ (кресты), MASP-2+/- (замкнутые кольца) и MASP-2-/- (замкнутые треугольники) мышей. На фиг. 5C показана относительная активность C4-конвертазы на планшетах, покрытых зимозаном (белые столбцы) или маннаном (темные столбцы) для MASP-2+/+ мышей (n=5) и MASP-2-/- мышей (n=4) относительно мышей дикого типа (n=5), измеренная по отложению C4b, нормализованного относительно сыворотки мышей дикого типа. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Как показано в фиг. 5A-5C, в покрытых маннаном и зимозаном планшетах плазма, полученная от MASP-2-/- мышей, является полностью дефицитной по активации комплемента, опосредованной лектиновым путем. Эти результаты с очевидностью демонстрируют, что MASP-2, а не MASP-1 или MASP-3 является эффекторным компонентом лектинового пути.

Рекомбинантный MASP-2 восстанавливает активацию C4, опосредованную лектиновым путем, в сыворотке, полученной от MASP-2-/- мышей.

Для установления факта, что отсутствие у MASP-2-/- мышей MASP-2 является непосредственной причиной потери активации C4, зависимой от лектинового пути, с помощью описанного выше анализа расщепления C4 оценивали влияние добавления рекомбинантного белка MASP-2 в образцы сыворотки. Рекомбинантные белки, функционально активный мышинный MASP-2 и каталитически неактивный мышинный MASP-2A (в котором сериновый остаток в активном участке домена сериновой протеазы замещен остатком аланина), получали и очищали, как описано ниже в примере 3. Объединенную сыворотку, полученную от четырех MASP-2-/- мышей, предварительно инкубировали с повышением концентрации рекомбинантного мышинного MASP-2 или неактивного рекомбинантного мышинного MASP-2A, и активность C4-конвертазы оценивали, как описано выше.

Результаты. Как показано на фиг. 6, добавление функционально активного мышинного рекомбинантного белка MASP-2 (показанного белыми треугольниками) в сыворотку, полученную от MASP-2-/- мышей, восстанавливало активацию C4, зависимую от лектинового пути, в зависимости от концентрации белка, при этом каталитически неактивный мышинный белок MASP-2A (показан звездочками) не восстанавливал активацию C4. Результаты, показанные на фиг. 6, нормализовали по отношению к активации C4, наблюдаемой в объединенной сыворотке мышей дикого типа (обозначено пунктирной линией).

Пример 3.

В этом примере показана рекомбинантная экспрессия и продуцирование рекомбинантных полно-размерных человеческих, крысиных и мышинных белков MASP-2, полипептидов, производных от MASP-2, и каталитически неактивных мутантных форм MASP-2.

Экспрессия полноразмерного человеческого, крысиного и мышинного MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4) также субклонировали в вектор экспрессии pCI-Neo млекопитающих (Promega), который управляет эукариотической экспрессией под контролем CMV энхансерной/промоторной области (описано у Kaufman R.J. et al., *Nucleic. Acids. Research.*, 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:531-66 (1991)). Полноразмерные мышиную кДНК (SEQ ID NO: 50) и крысиную кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 53) субклонировали в вектор экспрессии pED. Векторы экспрессии MASP-2 затем трансфицировали в адгезивные линии клеток яичников китайского хомячка DXB1 по стандартной процедуре трансфекции с использованием фосфата кальция, описанной у Maniatis et al., 1989. Клетки, трансфицированные такими конструкциями, развивались очень медленно, что можно объяснить цитотоксичностью кодируемой протеазы.

В другом подходе конструкцию минигена (SEQ ID NO:49), содержащую человеческую кДНК MASP-2, управляемую эндогенным промотором, подвергали временной трансфекции в клетках яичников китайского хомячка (CHO). Человеческий белок MASP-2, секретируемый в культуральную среду, выделяли по схеме, описанной ниже.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2.

Обоснование. MASP-2 активировали путем аутокаталитического расщепления после связывания субкомпонентов распознавания MBL или фиколинов (либо L-фиколина, H-фиколина, либо M-фиколина) с соответствующими им углеводными молекулами. Аутокаталитическое расщепление, приводящее к активации MASP-2, часто происходит во время процедуры выделения MASP-2 из сыворотки, либо во время очистки после рекомбинантной экспрессии. Для получения более стабильного препарата белка для применения в качестве антигена каталитически неактивную форму MASP-2, обозначенную как MASP-2A, создавали путем замещения остатка серина, который присутствует в каталитической триаде домена протеазы, остатком 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: 6 Ser618 на Ala618).

Для получения каталитически неактивных человеческих и мышинных белков MASP-2A осуществляли сайт-направленный мутагенез, используя олигонуклеотиды, представленные в табл. 5. Олигонуклеотиды, приведенные в табл. 5, создавали путем отжига с участком человеческой и мышинной кДНК, кодирующей ферментативно активный серин, а олигонуклеотид содержал несоответствие для замены кодона серина на кодон аланина. Например, ПЦР олигонуклеотиды SEQ ID NOS: 56-59 использовали в комбинации с человеческой кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) для амплификации участка от старт-кодона до ферментативно-активного серина и от серина до стоп-кодона для получения полного открытого считывания из мутированного MASP-2A, содержащего Ser618/Ala618 мутацию. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и получения полос, и получали одиночные аденозиновые перекрытия, используя стандартную процедуру наращивания. Затем MASP-2A с добавленным аденозином клонировали в вектор pGEM-T Easy, и трансформировали в *E.coli*.

Каталитически неактивный крысиный белок MASP-2A получали, подвергая SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 65 действию киназы и отжига путем объединения этих двух олигонуклеотидов в равных молярных объемах, нагревания при температуре 100°C в течение 2 мин и медленного охлаждения при комнатной температуре. Полученный в результате отжига фрагмент содержал PstI и XbaI совместимые концы и был вставлен вместо фрагмента PstI-XbaI кДНК крысиного MASP-2 дикого типа (SEQ ID NO: 53) с получением крысиного MASP-2A.

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

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

Затем каждый из человеческого, мышинного и крысиного MASP-2A субклонировали в векторы экспрессии млекопитающих pED или pCI-Neo и трансфицировали в линии клеток DXB1 яичников китайского хомячка, как описано ниже.

В другом подходе каталитически неактивную форму MASP-2 получали способом, описанным у Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276(28), 25894-25902, 2001. Вкратце плазмиду, содержащую полноразмерную кДНК человеческого MASP-2 (описано у Thiel et al. *Nature* 386:506, 1997), разрезали рестриктазами XhoI и EcoRI и кДНК MASP-2 (приведенную в настоящем описании в SEQ ID NO: 4) клонировали по соответствующим сайтам рестрикции в бакуловирусный вектор переноса pFastBad (Life Technologies, NY). Затем Ser618 в активном участке сериновой протеазы MASP-2 заменяли Ala618 путем замещения двухнуклеотидных олигонуклеотидов, кодирующих участок пептида с 610 по 625 аминокислоту (SEQ ID NO:13), природным участком с 610 по 625 аминокислоту для получения полноразмерного полипептида MASP-2 с неактивным протеазным доменом.

Конструирование экспрессионных плазмид, содержащих полипептидные участки, полученные от человеческого MASP-2.

Для обеспечения секреции различных доменов MASP-2 получали следующие конструкции с использованием сигнального пептида MASP-2 (остатки 1-15 в SEQ ID NO: 5). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBI человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 8), получали ПЦР амплификацией участка, кодирующего остатки 1-121 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствует N-терминальному домену CUBI). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGF человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 9), получали



ПЦР амплификацией участка, кодирующего остатки 1-166 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствует N-терминальному домену CUBIEGF). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGFCUBII человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 10), получали ПЦР амплификацией участка, кодирующего остатки 1-293 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствует N-терминальному домену CUBIEGFCUBII). Вышеуказанные домены амплифицировали методом ПЦР, используя Vent<sub>R</sub> полимеразу и pBS-MASP-2 в качестве матрицы, в соответствии с установленными способами ПЦР. В последовательность 5' праймера смыслового праймера (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' SEQ ID NO: 34) вводили сайт рестрикции BamHI (подчеркнутый) на 5'-конце ПЦР продукта. Антисмысловые праймеры для каждого домена MASP-2, показанные ниже в табл. 5, получали путем введения стоп-кодона (полужирный шрифт), за которым добавляли сайт EcoRI (подчеркнутый) на конце каждого ПЦР продукта. После амплификации фрагменты ДНК обрабатывали рестриктазами BamHI и EcoRI и клонировали в соответствующие участки вектора pFastBac1. Полученные в результате конструкции были охарактеризованы с помощью рестрикционного картирования и подтверждены секвенированием дцДНК.

Таблица 5

ПЦР праймеры для MASP-2

| домен MASP-2                                            | 5' ПЦР праймер                                                   | 3' ПЦР праймер                                                      |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 8<br>CUBI (aa 1-121 в SEQ ID NO: 6)          | 5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)                 | 5'GGAATTCCTAGGCTGCA TA (SEQ ID NO: 35)                              |
| SEQ ID NO: 9<br>CUBIEGF (aa 1-166 в SEQ ID NO: 6)       | 5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)                 | 5'GGAATTCCTACAGGGCG CT-3' (SEQ ID NO: 36)                           |
| SEQ ID NO: 10<br>CUBIEGFCUBII (aa 1-293 в SEQ ID NO: 6) | 5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)                 | 5'GGAATTCCTAGTAGTGG AT 3' (SEQ ID NO: 37)                           |
| SEQ ID NO: 4<br>Человеческий MASP-2                     | 5'ATGAGGCTGCTGACCCCTCCTCTGGGCCTTC-3' (SEQ ID NO: 56)             | 5'TTAAATCACTAATTAT GTTCTCGATC-3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_обратный   |
| SEQ ID NO: 4<br>кДНК человеческого MASP-2               | 5'CAGAGGTGACGCA GGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_прямой | 5'GTGCCCCCTCTGCGTCA CCTCTG-3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_обратный  |
| SEQ ID NO: 50<br>кДНК мышинного MASP-2                  | 5'ATGAGGCTACTCA TCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_прямой       | 5'TTAGAAATTAATTATTAT GTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_обратный |
| SEQ ID NO: 50<br>кДНК мышинного MASP-2                  | 5'CCCCCCTGCGTC ACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_прямой   | 5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_обратный  |

Эукариотическая экспрессия рекомбинантного MASP-2 и получение ферментативно неактивных мышинного, крысиного и человеческого белков MASP-2A.

Вышеописанные экспрессионные конструкции MASP-2 и MASP-2A трансфицировали в DXB1 клетки с помощью стандартной процедуры кальций-фосфатной трансфекции (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной питательной среде, чтобы исключить контаминацию препаратов другими сывороточными белками. Через день собирали конфлюэнтные клетки из питательных сред (в общей сложности процесс проводили четыре раза). Средний уровень рекомбинантного MASP-2A для каждого из трех видов составил примерно 1,5 мг/л культуральной среды.

Очистка белка MASP-2A. MASP-2A (мутантную форму Ser-Ala, описанную выше) очищали аффинной хроматографией на колонках с MBP-A-агарозой. Эта стратегия позволяет проводить быструю очистку без использования внешних маркеров. MASP-2A (100-200 мл питательной среды, разбавленной равным объемом загрузочного буфера (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, содержащего 150 mM NaCl и 25 mM CaCl<sub>2</sub>) загружали в колонку с MBP-агарозой (4 мл) для аффинной хроматографии, предварительно уравновешенную 10 мл загрузочного буфера. После промывки дополнительными 10 мл загрузочного буфера белок элюировали в 1 мл фракциях с 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, содержащим 1,25 M NaCl и 10 mM EDTA.

Фракции, содержащие MASP-2A, идентифицировали при помощи SDS электрофореза в полиакриламидном геле. При необходимости, MASP-2A дополнительно очищали при помощи ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (MR 5/5). Белок диализовали с 50 mM Tris-Cl pH 7,5, содержащим 50 mM NaCl, и загружали в колонку, уравновешенную тем же буфером. После промывки связанный MASP-2A элюировали 10 мл 0,05-1 M градиентным раствором NaCl.

Результаты. Выход белка MASP-2A составил 0,25-0,5 мг на 200 мл среды. Молекулярная масса, определенная методом MALDI-MS, составила 77,5 кДа, что превысило расчетную величину для немодифицированного полипептида (73,5 кДа) в связи с гликозилированием. Присоединение гликанов к каждому из сайтов N-гликозилирования объясняет наблюдаемую массу. MASP-2A мигрирует мигрировал в виде одной полосы в SDS-полиакриламидных гелях, свидетельствуя о том, что в процессе биосинтеза он не подвергся протеолитическому разложению. Средневзвешенная молекулярная масса, определенная путем равновесного ультрацентрифугирования, согласуется с расчетной величиной для гомодимеров гликозилированного полипептида.

Получение рекомбинантных полипептидов человеческого MASP-2.

Другой способ получения рекомбинантных производных полипептидов MASP-2 и MASP-2A описан у Thielens, N.M. et al., J. Immunol., 166:5068-5077, 2001. Вкратце клетки насекомого *Spodoptera frugiperda* (клетки Ready-Plaque Sf9, полученные от компании Novagen, Madison, WI) выращивают и поддерживают в бессывороточной питательной среде Sf90011 (Life Technologies), содержащей 50 ME/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Клетки насекомого *Trichoplusia ni* (High Five), полученные от Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France), поддерживают в среде TC100 (Life Technologies), содержащей 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France), дополненной 50 ME/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Рекомбинантные бакуловирусы получают с помощью системы Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмидную ДНК очищают с помощью системы очистки Qiagen midiprep (Qiagen) и используют для трансфекции клеток насекомых Sf9, используя селфектин в среде Sf900 II SFM (Life Technologies), согласно протоколу производителя. Рекомбинантные вирусные частицы собирают через 4 дня, титруют методом вирусных бляшек и амплифицируют, как описано у King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, p.111-114, 1992.

Клетки High Five ( $1,75 \times 10^7$  клеток/175-см<sup>2</sup> тканевой культуры в колбе) инфицировали рекомбинантными вирусами, содержащими полипептиды MASP-2, путем множественного инфицирования, 2 раза, в среде Sf900 II SFM при 28°C в течение 96 ч. Супернатанты собирали центрифугированием и добавляли диизопропил фосфорофлуоридат до получения конечной концентрации 1 mM.

Полипептиды MASP-2 секретируются в клеточной культуре в питательную среду. Культуральные супернатанты подвергли диализу против 50 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM триэтанолламин гидрохлорида, pH 8,1, и загружали со скоростью 1,5 мл/мин в колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), уравновешенную тем же буфером. Элюирование проводили, используя 1,2 л линейного градиента в 350 mM NaCl в этом же буфере. Фракции, содержащие рекомбинантные полипептиды MASP-2, идентифицировали вестерн-блот анализом, осаждали путем добавления (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 60% (по массе) и оставляли на ночь при 4°C. Осадки ресуспендировали в 145 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM триэтанолламин гидрохлорида, pH 7,4, и вносили в колонку TSK G3000 SWG (7,5×600 мм) (Tosohhaas, Montgomeryville, PA), уравновешенную тем же буфером. Затем очищенные полипептиды концентрировали до 0,3 мг/мл методом ультрафильтрации в микроконцентраторах Microserp (пороговое значение MW=10000) (Filtron, Karlstein, Germany).

Пример 4.

В этом примере описано получение поликлональных антител к MASP-2 полипептидам.

Материалы и методы.

MASP-2 антигены. Поликлональную антисыворотку против человеческого MASP-2 получали иммунизацией кроликов следующими выделенными полипептидами MASP-2:

человеческий MASP-2 (SEQ ID NO: 6), выделенный из сыворотки;  
рекомбинантный человеческий MASP-2 (SEQ ID NO: 6), MASP-2A, содержащий неактивный домен протеазы (SEQ ID NO: 13), описанный в примере 3; и  
рекомбинантные CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) и CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10), экспрессированные, как описано в примере 3.

Поликлональные антитела. Шестинедельных кроликов, примированных BCG (вакциной против бациллы Кальметта-Герена), иммунизировали путем введения в виде инъекции 100 мкг полипептида MASP-2 в концентрации 100 мкг/мл в физиологическом растворе. Инъекции осуществляли каждые 4 недели титром антител, который отслеживали методом ИФА, как описано в примере 5. Культуральные супернатанты собирали для очистки антител с помощью аффинной хроматографии с белком А.

Пример 5.

В этом примере описан способ получения мышинных моноклональных антител против крысиных или человеческих полипептидов MASP-2.

### Материалы и методы.

Самцам мышей линии A/J (Harlan, Houston, Tex.) в возрасте 8-12 недель подкожно вводили 100 мкг человеческих или крысиных полипептидов rMASP-2 или rMASP-2A (полученных, как описано в примере 3) в полном адьюванте Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS), pH 7,4. Мыши дважды получали подкожные инъекции 50 мкг человеческого или крысиного полипептида rMASP-2 или rMASP-2A в неполном адьюванте Фрейнда с двухнедельными интервалами. На четвертой неделе мыши получили инъекцию 50 мкг человеческого или крысиного полипептида rMASP-2 или rMASP-2A в PBS, и через 4 дня мыши были использованы для слияния.

Для каждого слияния готовили одноклеточные суспензии из селезенки иммунизированной мыши и использовали для слияния с Sp2/0 клетками миеломы. Слияние  $5 \times 10^8$  клеток Sp2/0 и  $5 \times 10^8$  клеток селезенки осуществляли в среде, содержащей 50% полиэтиленгликоля (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) и 5% диметилсульфоксида (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Затем концентрацию клеток доводили до  $1,5 \times 10^5$  клеток селезенки в 200 мкл суспензии в среде Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), дополненной 10% фетальной сыворотки, 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мМ аминокпертина и 16 мМ тимидина. Двести микролитров клеточной суспензии добавляли в каждую лунку из примерно двадцати 96-луночных микропланшетов. Через десять дней методом ИФА выполняли скрининг культуральных супернатантов на их способность вступать в реакцию с очищенным фактором MASP-2.

Анализ ИФА. Лунки микропланшетов Immunol® 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покрывали путем добавления 50 мкл очищенного hMASP-2 или крысиного rMASP-2 (или rMASP-2A) с концентрацией 50 нг/мл в течение ночи при комнатной температуре. Низкая концентрация MASP-2 для покрытия обеспечивает возможность для отбора высокоаффинных антител. После удаления раствора для покрытия путем встряхивания планшета, в каждую лунку на один час для блокирования неспецифических сайтов добавляли 200 мкл BLOTTO (обезжиренное сухое молоко) в PBS. Через час лунки промывали буфером PBST (PBS с содержанием 0,05% Твин 20). Пятьдесят микролитров культуральных супернатантов от каждого слияния собирали и смешивали с 50 мкл BLOTTO и затем добавляли в отдельные лунки микропланшетов. Через час инкубации лунки промывали PBST. Затем связанные мышинные антитела детектировали с помощью реакции с козлиными антимышиными IgG (Fc-специфичными), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.), и разбавляли в соотношении 1:2000 в BLOTTO. Раствор субстрата пероксидазы, содержащий 0,1% 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, Louis, Mo.) и 0,0003% перекиси водорода (Sigma), добавляли в лунки и оставляли на 30 мин для проявления окрашивания. Реакцию завершали добавлением в каждую лунку 50 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность реакционной смеси при 450 нм определяли с помощью прибора BioTek ELISA Reader (BioTek® Instruments, Winooski, Vt.).

### Анализ связывания MASP-2.

Культуральные супернатанты, давшие положительный результат в анализе MASP-2 методом ИФА, как описано выше, могут быть протестированы в анализе связывания для определения сродства связывания ингибирующих MASP-2 агентов с MASP-2. Аналогичный анализ может быть использован для определения способности ингибирующего агента связываться с другими антигенами в системе комплемента.

Лунки полистирольного микропланшета (96-луночные планшеты для связывания среды, Corning Costar, Cambridge, MA) покрывали MASP-2 (20 нг/100 мкл на лунку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), pH 7,4, в течение ночи при 4°C. После удаления раствора MASP-2 лунки блокировали PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma Chemical), в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки без покрытия MASP-2 использовали в качестве контроля. В лунки добавляли аликвоты гибридомных супернатантов или очищенных анти-MASP-2 MoAb с изменяющейся концентрацией в блокирующем растворе. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре лунки обильно промывали PBS. MASP-2-связанное анти-MASP-2 MoAb детектировали путем добавления конъюгированных с пероксидазой козлиных антимышиных IgG (Sigma Chemical) в блокирующий раствор, который инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова ополаскивали PBS, после чего добавляли 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцию TMB останавливали путем добавления 100 мкл 1 М фосфорной кислоты и планшет считывали при 450 нм с помощью устройства считывания микропланшетов (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Затем культуральные супернатанты из положительных лунок тестировали на способность подавлять активацию комплемента в функциональном анализе, таком как анализ расщепления C4, как описано в примере 2. После этого клетки из положительных лунок клонировали методом серийных разведений. MoAb снова тестировали методом ИФА на их способность вступать в реакцию с hMASP-2, как описано выше. Отобранные гибридомы выращивали во вращающихся колбах, и истощенный культуральный супернатант собирали для очистки антител с помощью аффинной хроматографии с белком A.

## Пример 6.

В этом примере описано получение и продуцирование гуманизированных мышинных анти-MASP-2 антител и фрагментов антител.

Мышиное анти-MASP-2 моноклональное антитело получали у самцов мышей линии A/J, как описано в примере 5. Затем мышинное антитело подвергали процессу гуманизации, как описано ниже, для уменьшения его иммуногенности путем замены мышинных константных областей человеческими аналогами с получением химерного IgG и Fab-фрагмента антитела, который может быть использован для подавления побочных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у людей, в соответствии с настоящим изобретением.

1. Клонирование генов вариабельных участков анти-MASP-2 из клеток мышинной гибридомы. Общую РНК выделяли из клеток гибридомы, секретирующих анти-MASP-2 MoAb (полученной, как описано в примере 7), используя RNeasy в соответствии с протоколом производителя (Qiagen, Crawley, UK). Первую цепь кДНК синтезировали на основе общей РНК, используя олиго dT в качестве праймера. ПЦР выполняли, используя 3'-праймеры, полученные из константной C-области иммуноглобулина, и наборы вырожденных праймеров, полученных из лидерного пептида или первой каркасной области генов мышинных V<sub>H</sub> или V<sub>K</sub>, в качестве 5'-праймеров. Заякоренную ПЦР выполняли, как описано у Chen и Platsucas (Chen, P.F., Scand. J. Immunol., 35:539-549, 1992). Для клонирования гена V<sub>K</sub> получали двухцепочную кДНК с помощью праймера Not1-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Подвергнутые отжигу адаптеры AD1 (5'-GGAATTCCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) и AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) лигировали с обоими 5'- и 3'-концами двухцепочной кДНК. Адаптеры на 3'-концах удаляли путем расщепления Not1. Затем продукт расщепления использовали в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 в качестве 5'-праймера и MAK2 (5'-CATTTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41) в качестве 3'-праймера. Фрагменты ДНК длиной примерно 500 пар оснований клонировали в вектор pUC19. Несколько клонов отбирали для анализа последовательности для подтверждения того, что клонированная последовательность охватывает требуемую константную область мышинного иммуноглобулина. Олигонуклеотиды Not1-MAK1 и MAK2 получали из области V<sub>K</sub> и располагали на участках 182 и 84 п.о. соответственно ниже от первой пары оснований гена C карпа. Отбирали клоны, которые содержали полноразмерный V<sub>K</sub> и лидерный пептид.

Для клонирования гена V<sub>H</sub> получали двухцепочную кДНК с помощью праймера Not1-MAG1 (1'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-5' SEQ ID NO: 42). Подвергнутые отжигу адаптеры AD1 и AD2 лигировали с обоим 5'- и 3'-концами двухцепочной кДНК. Адаптеры на 3'-концах удаляли путем расщепления Not1. Затем продукт расщепления использовали в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 и MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) в качестве праймеров. Фрагменты ДНК размером 500 до 600 п.о. клонировали в pUC19. Олигонуклеотиды Not1-MAG1 и MAG2 получали из мышинной области C<sub>H</sub>7.1 и располагали на участках 180 и 93 п.о. соответственно ниже от первой пары оснований в гене мышинного C<sub>H</sub>7.1. Отбирали клоны, которые содержали полноразмерный V<sub>H</sub> и лидерный пептид.

2. Конструирование векторов экспрессии для химерного MASP-2 IgG и Fab. Клонированные гены V<sub>H</sub> и V<sub>K</sub>, описанные выше, использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР для добавления консенсусной последовательности Козака к 5'-концу и донора сплайсинга к 3'-концу нуклеотидной последовательности. После анализа последовательностей на отсутствие ПЦР ошибок гены V<sub>H</sub> и V<sub>K</sub> встраивали в каскеты векторов экспрессии, содержащих человеческий C<sub>H</sub>1 и C<sub>κ</sub>каппа соответственно, с получением pSV2neoVH-huC<sub>H</sub>1 и pSV2neoV-huC<sub>κ</sub>. Очищенные в градиенте CsCl плазмидные ДНК векторов тяжелой и легкой цепей использовали для трансфекции клеток COS методом электропорации. Через 48 ч инкубации культуральный супернатант тестировали методом ИФА для подтверждения наличия примерно 200 нг/мл химерного IgG. Из собранных клеток выделяли тотальную РНК. Первую цепь кДНК синтезировали на основе тотальной РНК, используя олиго dT в качестве праймера. Эту кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР для получения ДНК фрагментов для Fd и карпа. Для гена Fd выполняли ПЦР, используя 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO: 44) в качестве 5'-праймера и 3'-праймер, выделенный из CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45). Подтверждали, что последовательность ДНК содержит полноценный V<sub>H</sub> и домен CH1 человеческого IgG1. После проведения расщепления соответствующими ферментами фрагменты ДНК для Fd встраивали в сайты рестрикции HindIII и BamHI в каскете вектора экспрессии pSV2dhfr-TUS для получения pSV2dhfrFd. Плазмида pSV2 является коммерчески доступной и состоит из сегментов ДНК, полученных из различных источников:

ДНК pBR322 (тонкая линия) содержит сайт начала репликации ДНК pBR322 (pBR ori) и ген устойчивости лактамазы к ампицилину (Amp<sup>r</sup>);

ДНК SV40, показанная широкими штрихами и маркировкой, содержит сайт начала репликации ДНК SV40 (SV40 ori), ранний промотор (5' к генам dhfr и neo) и сигнал полиаденилирования (3' к генам dhfr и neo).

Сигнал полиаденилирования, полученный из SV40 (pA), также помещали на 3'-конец гена Fd.

Для гена карпа проводили ПЦР, используя 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) в качестве 5'-праймера и 3'-праймер, полученный из С<sub>к</sub> (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Подтверждали, что последовательность ДНК содержит участки полноразмерного V<sub>κ</sub> и человеческого С<sub>κ</sub>. После расщепления соответствующими ферментами рестрикции ДНК фрагменты для карпа встраивали в сайты рестрикции HindIII и BamHI в кассете вектора экспрессии pSV2neo-TUS с получением pSV2neoK. Экспрессию обоих генов Fd и карпа иницировали с помощью энхансера и промотора, полученных из HCMV. Так как ген Fd не включает остаток цистеиновой аминокислоты, принимающий участие в образовании дисульфидной связи между цепями, этот рекомбинантный химерный Fab содержит нековалентным образом связанные тяжелые и легкие цепи. Этот химерный Fab обозначен как cFab.

Для получения рекомбинантного Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями вышеуказанный ген Fd может быть удлинен путем включения последовательности, кодирующей девять 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 получения клеточных линий, секретирующих химерный анти-MASP-2 IgG, клетки NSO трансфицировали очищенными ДНК плазмидами pSV2neoVH-huC.γ1 и pSV2neoV-huC карпа методом электропорации. Трансфицированные клетки отбирали в присутствии 0,7 мг/мл G418. Клетки выращивали в 250 мл вращающейся колбе со средой, содержащей сыворотку.

Культуральный супернатант, полученный после центрифугирования 100 мл культуры, загружали в 10 мл колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). Колонку промывали 10 объемами слоя PBS. Связанное антитело элюировали 50 mM цитратным буфером, pH 3,0. Равный объем 1 M HEPES, pH 8,0, добавляли к фракции, содержащей очищенное антитело, для доведения pH до 7,0. Остаточные соли удаляли путем замены буфера на PBS методом ультрафильтрации через мембрану Millipore (пороговое значение MW: 3000). Концентрацию белка очищенного антитела определяли методом BCA (Pierce).

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

Для получения клеточных линий, секретирующих химерные анти-MASP-2 Fab, клетки CHO трансфицировали очищенными ДНК плазмидами pSV2dhfrFd (или pSV2dhfrFd/9aa) и pSV2neokarpa методом электропорации. Трансфицированные клетки отбирали в присутствии G418 и метотрексата. Отобранные клеточные линии размножали при повышенных концентрациях метотрексата. Клетки были представлены одиночными клетками, субклонированными методом серийных разведений. Затем высокопродуктивные клеточные линии, полученные от субклонированных одиночных клеток, выращивали в 100 мл культуры в бессывороточной среде при постоянном перемешивании.

Химерное анти-MASP-2 Fab очищали методом аффинной хроматографии с использованием мышинного анти-идиотипического MoAb к MASP-2 MoAb. Анти-идиотипическое MASP-2 MoAb может быть получено путем иммунизации мышей мышинным анти-MASP-2 MoAb, конъюгированным с гемоцианином фиссуреллы (KLH), а затем подвергнуто скринингу на специфическое связывание с MoAb, которое может конкурировать с человеческим MASP-2. Для очистки, 100 мл супернатанта из культуры клеток CHO, продуцирующих cFab или cFab/9aa, загружали в аффинную колонку со связанным анти-идиотипическим MASP-2 MoAb. Затем колонку тщательно промывали PBS до элюции связанного Fab 50 mM диэтиламином, pH 11,5. Остаточные соли удаляли путем замены буфера, как описано выше. Концентрацию белка очищенного Fab определяли методом BCA (Pierce).

Способность химерных MASP-2 IgG, cFab и cFab/9aa подавлять MASP-2-зависимый путь активации комплемента может быть определена путем анализа подавления, описанного в примере 2.

### Пример 7.

В этом примере описан анализ расщепления C4 *in vitro*, используемый в качестве функционального скрининга для идентификации ингибирующих MASP-2 агентов, способных подавлять MASP-2-зависимую активацию, с помощью L-фиколина/P35, H-фиколина, M-фиколина или маннана.

Анализ расщепления C4. Анализ расщепления C4 описан у Petersen et al., J. Immunol. Methods, 257:107 (2001), в котором измеряли активацию лектинового пути, инициированную липотейхоевой кислотой (LTA) из *S. aureus*, которая связывается с L-фиколином.

Реагенты: Фиксированный в формалине препарат *S. aureus* (DSM20233) готовили следующим образом: бактерии выращивали в течение ночи при 37°C в среде на основе триптон-соевого агара с добавлением крови, трижды промывали PBS, затем фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS/0,5% формалин и трижды отмывали PBS перед ресуспендированием в буфере для иммобилизации (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6).

Анализ. Лунки микропланшета Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покрывали 100 мкл препарата фиксированного в формалине *S. aureus* DSM20233 (00550=0,5) в буфере для иммобилизации с 1 мкг L-фиколина. После инкубации в течение ночи лунки блокированы 0,1% раствором сывороточного альбумина человека (HSA) в TBS (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4), затем промыва-

ли TBS, содержащим 0,05% Твин 20 и 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  (промывочный буфер). Образцы человеческой сыворотки растворяли в 20 мМ Tris-HCl, 1 М NaCl, 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, который предотвращал активацию эндогенного C4 и приводил к диссоциации комплекса C1 (состоящего из C1q, C1r и C1s). Ингибирующие MASP-2 агенты, включая анти-MASP-2 MoAb и ингибирующие пептиды, добавляли к образцам сыворотки в различных концентрациях. Разведенные образцы наносили на планшеты и инкубировали в течение ночи при 4°C. Через 24 ч планшеты тщательно промывали промывочным буфером, затем в каждую лунку добавляли 0,1 мкг очищенного человеческого C4 (полученного, как описано у Dodds, A.W., *Methods Enzymol.*, 223:46, 1993) в 100 мкл 4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4. Через 1,5 ч инкубации при 37°C планшеты снова промывали, и определяли отложение C4b, используя конъюгированный с щелочной фосфатазой куриный античеловеческий C4c (Immunosystem, Uppsala, Sweden), и измеряли колориметрическим методом с помощью субстрата п-нитрофенилфосфат.

Анализ C4 на маннane. Вышеописанный анализ адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством MBL путем покрытия планшета ЛПС и маннаном перед добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 агентами.

Анализ C4 по Н-фиколину (Nakata Ag). Вышеописанный анализ адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством Н-фиколина путем покрытия планшета ЛПС и Н-фиколином перед добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 агентами.

#### Пример 8.

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

Методы. Иммунные комплексы получали *in situ* путем покрытия микропланшетов (Maxisorb, Nunc, кат. No442404, Fisher Scientific) 0,1% раствором человеческого сывороточного альбумина в 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, pH 7,4 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C с овечьей антицельной антисывороткой (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland), разведенной в соотношении 1:1000 смесью TBS/Твин/ $\text{Ca}^{2+}$ . Образцы сыворотки получали от мышей дикого типа и MASP-2<sup>-/-</sup> мышей и добавляли в покрытые планшеты. Готовили контрольные образцы, в которых C1q извлекали из образцов сыворотки мышей дикого типа и MASP-2<sup>-/-</sup> мышей. Мышиную сыворотку, обедненную по C1q, готовили с помощью связанных с белком А микросфер Dynabeads® (Dynal Biotech, Oslo, Norway), покрытых кроличьими античеловеческими IgG C1q (Dako, Glostrup, Denmark), в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты инкубировали в течение 90 мин при 37°C. Связанный C3b детектировали с помощью поликлональных античеловеческих C3c антител (Dako A 062), разбавленных в TBS/Твин/ $\text{Ca}^{++}$  в соотношении 1:1000. Вторичное антитело представляло собой козлиные антикроличьи IgG.

Результаты. На фиг. 9 показаны относительные уровни отложения C3b на покрытых IgG планшетах в сыворотке дикого типа, сыворотке MASP-2<sup>-/-</sup>, обедненной по C1q сыворотке дикого типа и обедненной по C1q сыворотке MASP-2<sup>-/-</sup>. Эти результаты свидетельствуют о том, что у мышей линии MASP-2<sup>-/-</sup> классический путь остается незатронутым.

#### Пример 9.

Следующий анализ использовали для проверки способности ингибирующего MASP-2 агента блокировать классический путь активации путем изучения действия ингибирующего MASP-2 агента в условиях инициации классического пути иммунными комплексами.

#### Методы.

Для оценки действия ингибирующего MASP-2 агента в условиях активации комплемента, при которых инициация классического пути осуществляется иммунными комплексами, три образца сыворотки, по 50 мкл каждая, содержавшие 90% NHS, инкубировали при 37°C в присутствии 10 мкг/мл иммунного комплекса (IC) или PBS, и параллельно инкубировали еще три образца (+/-IC), содержащие 200 нМ антипропердин моноклональных антител, при 37°C. После двухчасовой инкубации при 37°C во все образцы добавляли 13 мМ ЭДТА для остановки дальнейшей активации комплемента, после чего все образцы немедленно охлаждали до 5°C. Затем образцы хранили при -70°C до момента их использования в анализе на продукты активации комплемента (C3a и sC5b-9) с помощью набора ИФА (Quidel, кат. № A015 и A009) в соответствии с инструкциями производителя.

#### Пример 10.

В этом примере описана идентификация высокоаффинных фрагментов Fab2 анти-MASP-2 антител, блокирующих активность MASP-2.

Предпосылки и обоснование: MASP-2 представляет собой белковый комплекс со множеством отдельных функциональных доменов, включая участок(и) связывания для MBL и фиколинов, каталитический участок сериновой протеазы, участок связывания для протеолитического субстрата C2, участок связывания для протеолитического субстрата C4, участок расщепления MASP-2 для самоактивации зимогена MASP-2 и два  $\text{Ca}^{++}$ -связывающих участка. Идентифицированы фрагменты Fab2 антител, которые являются высокоаффинными по отношению к MASP-2, и эти идентифицированные Fab2-фрагменты были протестированы в функциональном анализе для определения их способности блокировать функциональ-

ную активность MASP-2.

Для блокирования функциональной активности MASP-2 антитело или Fab2-фрагмент антитела должен связываться или интерферировать со структурным эпитопом на MASP-2, который необходим для функциональной активности MASP-2. Следовательно многие или все высокоаффинные связывающие анти-MASP-2 Fab2 не обладают способностью подавлять функциональную активность MASP-2, если они не связываются со структурными эпитопами на MASP-2, которые принимают непосредственное участие в функциональной активности MASP-2.

Функциональный анализ по измерению подавления образования C3-конвертазы лектинового пути использовали для оценки "блокирующей активности" анти-MASP-2 Fab2. Известно, что первичная физиологическая роль MASP-2 в активации комплемента по лектиновому пути состоит в образовании следующего функционального компонента лектинзависимой активации комплемента, известного как C3-конвертаза лектинового пути. C3-конвертаза лектинового пути представляет собой критический ферментный комплекс (C4bC2a), который осуществляет протеолитическое расщепление C3 на C3a и C3b. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); однако функциональная активность MASP-2 необходима для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержат C3-конвертазу лектинового пути. Кроме того, все отдельные виды функциональной активности MASP-2, перечисленные выше, являются необходимыми для образования с участием MASP-2 C3-конвертазы лектинового пути. По этой причине предпочтительным способом анализа для оценки "блокирующей активности" анти-MASP-2 Fab2 считается функциональный анализ, который позволяет выполнять измерение подавления образования C3-конвертазы лектинового пути.

Образование высокоаффинных Fab2. Для создания высокоаффинных Fab2 к крысиному белку MASP-2 (SEQ ID NO: 55) использовали библиотеку фагового дисплея последовательностей легкой и тяжелой цепей человеческого антитела и автоматизированную технологию отбора антител для идентификации Fab2, которые реагируют с выбранными лигандами, представляющими интерес. Известное количество крысиного белка MASP-2 (~1 мг, >85% чистоты) использовали для скрининга антител. Для отбора антител с наилучшим сродством использовали три цикла амплификации. Для скрининга методом ИФА отбирали примерно 250 различных вариантов, экспрессирующих фрагменты антител. Высокоаффинные варианты впоследствии секвенировали для определения уникальности различных антител.

Пятьдесят уникальных анти-MASP-2 антител очищали и 250 мкг каждого очищенного антитела Fab2 использовали для характеристики сродства связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента, как описано более подробно ниже.

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

1. Анализ для измерения подавления образования C3-конвертазы лектинового пути.

Предпосылки. C3-конвертаза лектинового пути представляет собой ферментативный комплекс (C4bC2a), который осуществляет протеолитическое расщепление C3 на два потенциальных провоспалительных фрагмента, анафилатоксин C3a и опсонин C3b. Образование C3-конвертазы является ключевым этапом в лектиновом пути с точки зрения опосредования воспаления. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы (C4bC2a) лектинового пути, поэтому анти-MASP-2 антитела (или Fab2) не будут напрямую подавлять активность ранее существовавшей C3-конвертазы. Однако для получения двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержат C3-конвертазу лектинового пути, требуется активность сериновой протеазы MASP-2. Следовательно, анти-MASP-2 Fab2, которые подавляют функциональную активность MASP-2 (т.е. блокируют анти-MASP-2 Fab2), будут подавлять *de novo* образование C3-конвертазы лектинового пути. C3 содержит необычную и высокореактивную тиоэфирную группу в своей структуре. При расщеплении C3 C3-конвертазой в этом анализе тиоэфирная группа на C3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминок группами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает обнаружение C3b методом ИФА.

Дрожжевой маннан известен как активатор лектинового пути. В следующем методе измерения образования C3-конвертазы пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°C с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали на наличие C3b, иммобилизованного в лунках, стандартными методами ИФА. Количество C3b, образованного в этом анализе, является прямым отражением *de novo* образования C3-конвертазы лектинового пути. Анти-MASP-2 Fab2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе на их способность подавлять образование C3-конвертазы и последующее образование C3b.

Методы.

96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разбавленным в 50 mM карбонатном буфере (pH 9,5) в количестве 1,0 мкг/50 мкл/лунка. После ночной инкубации каждую лунку трижды промывали 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 100 мкл/лунку 1%-ным бычьим сывороточным альбумином в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при легком помешивании. Каждую лунку трижды промывали 200 мкл PBS. Образцы анти-MASP-2 Fab2 разбавляли до выбранных концентраций буфером GVB, содержащим  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  (4,0 mM барбита-ла, 141 mM NaCl, 1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°C. В указанные выше образ-

цы добавляли 0,5% крысиную сыворотку при 5°C, и по 100 мкл вносили в каждую лунку. Планшеты закрывали крышкой и инкубировали в течение 30 мин на водяной бане при 37°C для активации компонента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS-Твин 20 (0,05% Твин 20 в PBS), затем дважды промывали 200 мкл PBS. Первичное антитело (кроличье античеловеческое СЗс, DAKO A0062) с разведением 1:10000 в количестве 100 мкл/лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. Вторичное антитело (конъюгированное с пероксидазой козлий антикроличий IgG, American Qualex A102PU) с разведением 1:10000 в количестве 100 мкл/лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. Пероксидазный субстрат ТМВ (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в количестве 100 мкл/лунку и измеряли  $\text{OD}_{450}$ .

## 2. Анализ для измерения подавления MASP-2-зависимого расщепления C4.

Предпосылки. Активность сериновой протеазы MASP-2 имеет высокую специфичность, и только два белковых субстрата идентифицированы для MASP-2, C2 и C4. При расщеплении C4 образуются C4a и C4b. Анти-MASP-2 Fab2 может связываться со структурными эпитопами на MASP-2, которые принимают непосредственное участие в расщеплении C4 (например, MASP-2-связывающий участок для C4; MASP-2-каталитический участок сериновой протеазы) и таким образом подавляют функциональную активность MASP-2, приводящую к расщеплению C4.

Дрожжевой маннан известен как активатор лектинового пути. В описанном ниже способе измерения активности MASP-2 по расщеплению C4, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°C с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Поскольку первичные антитела, использованные в этом методе ИФА, распознают только C4, разбавленную крысиную сыворотку также дополняли человеческим C4 (1,0 мкг/мл). Затем лунки промывали и анализировали на наличие человеческого C4b, иммобилизованного на лунках, стандартными способами ИФА. Количество образованного в этом анализе C4b является мерой MASP-2-зависимой активности расщепления C4. Анти-MASP-2 Fab2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе на их способность подавлять расщепление C4.

Методы. 96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разбавленным в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,5) в количестве 1,0 мкг/50 мкл/лунка. Каждую лунку промывали три раза 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 100 мкл/лунку 1%-ным бычьим сывороточным альбумином в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при легком помешивании. Каждую лунку промывали три раза 200 мкл PBS. Образцы анти-MASP-2 Fab2 добавляли до выбранных концентраций буфером GVB, содержащим  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  (4,0 мМ барбитала, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°C. В эти образцы также вводили 1,0 мкг/мл человеческого C4 (Quidel). В указанные выше образцы добавляли 0,5% крысиной сыворотки при 5°C, и по 100 мкл вносили в каждую лунку. Планшеты закрывали крышкой и инкубировали в течение 30 мин на водяной бане при 37°C для активации компонента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS-Твин 20 (0,05% Твин 20 в PBS), затем каждую лунку дважды промывали 200 мкл PBS. Конъюгированный с биотином куриный античеловеческий C4 (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) с разведением 1:700 в количестве 100 мкл/лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. 0,1 мкг/мл конъюгированный с пероксидазой стрептавидин (Pierce Chemical #21126) в количестве 100 мкл/лунку добавляли в PBS, содержащий 2,0 мг/мл BSA и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. Пероксидазный субстрат ТМВ (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в количестве 100 мкл/лунку и измеряли  $\text{OD}_{450}$ .

## 3. Анализ связывания антикрысиного MASP-2 Fab2 с нативным крысиным MASP-2.

Предпосылки: MASP-2 обычно присутствует в плазме в форме димерных комплексов MASP-2, которые также включают специфические лектиновые молекулы (маннозосвязывающий белок (MBL) и фиколины). Как следствие, при наличии интереса к изучению связывания анти-MASP-2 Fab2 с физиологически релевантной формой MASP-2, важно разработать анализ связывания, в котором используется взаимодействие Fab2 не с очищенным рекомбинантным MASP-2, а с нативным MASP-2 в плазме. В таком анализе связывания нативный комплекс MASP-2-MBL из 10%-ной крысиной сыворотки сначала иммобилизуют в лунках, покрытых маннаном. Затем изучают сродство связывания различных анти-MASP-2 Fab2 по отношению к иммобилизованному нативному MASP-2 стандартным методом ИФА.



Методы. 96-луночные планшеты Costar High Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разбавленным в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,5) в количестве 1/50 мкл/лунка. Каждую лунку промывали три раза 200 мкл PBS. Лунки блокировали 0,5% обезжиренным сухим молоком в PBST (PBS с 0,05% Твин 20) в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при легком помешивании. Каждую лунку промывали три раза 200 мкл промывочного буфера TBS/Твин/Ca<sup>++</sup> (физиологический раствор, забуференный Трис, 0,05% Твин 20, содержащий 5,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). На льду готовили 10% крысиную сыворотку в буфере иммобилизации с высоким содержанием соли (20 мМ Tris, 1,0М NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Triton X100, 0,1% (в/о) бычий сывороточный альбумин, pH 7,4). 100 мкл/лунку добавляли и инкубировали в течение ночи при 5°C. Лунки промывали три раза 200 мкл промывочным буфером TBS/Твин/Ca<sup>++</sup>. Затем лунки промывали два раза 200 мкл PBS. 100 мкл/лунка выбранной концентрации анти-MASP-2 Fab2, разбавленных в буфере GVB, содержащем Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1% желатин, pH 7,4) добавляли и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. Конъюгированные с HRP козлиные анти-Fab2 (Biogenesis кат. № 0500-0099), разбавленные в соотношении 1:5000 в 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в PBS, добавляли в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при слабом перемешивании. Каждую лунку промывали пять раз 200 мкл PBS. Пероксидазный субстрат TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 70 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 1,0 М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в количестве 100 мкл/лунку и измеряли OD<sub>450</sub>.

#### Результаты.

Примерно 250 разных Fab2, которые реагировали с высоким сродством с крысиным белком MASP-2 отбирали для скрининга методом ИФА. Эти высокоаффинные Fab2 секвенировали для определения уникальности различных антител и 50 уникальных анти-MASP-2 антител очищали для дальнейшего анализа. 200 мкг каждого очищенного антитела Fab2 использовали для характеристики сродства связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента. Результаты этого анализа представлены ниже в табл. 6.

Таблица 6  
Анти-MASP-2 Fab2, блокирующие активацию комплемента по лектинового пути

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

Как показано выше в табл. 6, из 50 протестированных анти-MASP-2 Fab2 семнадцать Fab2 были идентифицированы как Fab2, блокирующие MASP-2, которые потенциально могут подавлять образование C3-конвертазы с IC<sub>50</sub>, равным или менее 10 нмоль Fab2 (34%-ный положительный коэффициент успеха). Восемь из семнадцати идентифицированных Fab2 имеют значение IC<sub>50</sub> в субнаномолярной области. Помимо этого, все семнадцать Fab2, блокирующие MASP-2, показанные в табл. 6, по существу демонстрируют полное подавление образования C3-конвертазы в анализе C3-конвертазы лектинового пути. На фиг. 8А графически показаны результаты анализа образования C3-конвертазы для антитела Fab2

№ 11, которое является типичным представителем протестированных антител Fab2, результаты которых приведены в табл. 6. Этот факт является важным, поскольку он предполагает теоретическую возможность того, что "блокирующее" Fab2 может только частично подавлять функцию MASP-2 даже, когда каждая молекула MASP-2 связывается с Fab2.

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, существует теоретическая возможность того, что наличие антиманнанных антител в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и генерировать C3b посредством C3-конвертазы классического пути. Однако каждое из семнадцати блокирующих анти-MASP-2 Fab2, перечисленных в этом примере, потенциально могут подавлять образование C3b (>95%), таким образом, демонстрируя специфичность данного анализа в отношении C3-конвертазы лектинового пути.

Анализ связывания также выполняли для всех семнадцати блокирующих Fab2 с целью подсчета кажущегося  $K_d$  для каждого из них. Результаты анализа связывания анти-крысиных MASP-2 Fab2 с нативными крысиными MASP-2 для шести блокирующих Fab2 также представлены в табл. 6. На фиг. 8B графически показаны результаты анализа связывания антитела Fab2 № 11. Подобный анализ связывания также выполняли для других Fab2, результаты которых представлены в табл. 6. В основном, кажущиеся  $K_d$ , полученные для связывания каждого из шести Fab2 с нативным MASP-2, полностью соответствуют  $IC_{50}$  для Fab2 в функциональном анализе C3-конвертазы. Существуют доказательства того, что MASP-2 подвергается конформационным изменениям из неактивной в активную форму при активации ее протеазной активностью (Feinberg et al., EMBO J., 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem., 280:33435-44 (2005)). В нормальной крысиной плазме, используемой в анализе образования C3-конвертазы, MASP-2 присутствует в основном в "неактивной" конформации зимогена. В противоположность этому, в анализе связывания MASP-2 присутствует в виде части комплекса с MBL, связанного с иммобилизованным маннаном; поэтому, MASP-2 скорее представлен "активной" конформацией (Petersen et al., J. Immunol Methods, 257:107-16, 2001). Следовательно, не следует ожидать четкой связи между  $IC_{50}$  и  $K_d$  для каждого из семнадцати блокирующих Fab2, протестированных в этих двух функциональных анализах, поскольку в каждом анализе Fab2 будет связываться с различными конформационными формами MASP-2. Тем не менее за исключением Fab2 № 88, по-видимому, существует достаточно близкое соответствие между  $IC_{50}$  и кажущимся  $K_d$  для каждого из остальных шестнадцати Fab2, протестированных в двух тестах (см. табл. 6).

Некоторые блокирующие Fab2 оценивали на способность подавлять MASP-2-зависимое расщепление C4. На фиг. 8C графически показаны результаты анализа расщепления C4, демонстрирующие подавление в случае Fab2 № 41, с  $IC_{50}=0,81$  нМ (см. табл. 6). Как показано на фиг. 9, все из протестированных Fab2 подавляли расщепление C4 со значениями  $IC_{50}$ , аналогичными тем, которые были получены в анализе C3-конвертазы (см. табл. 6).

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, существует теоретическая возможность того, что наличие антиманнанных антител в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и, таким образом, генерировать C4b посредством расщепления C4, опосредованного C1s. Однако было идентифицировано несколько анти-MASP-2 Fab2, которые эффективно подавляли образование C4b (>95%), тем самым демонстрируя специфичность этого анализа в отношении MASP-2-опосредованного расщепления C4. C4, подобно C3, содержит в своей структуре необычную и высокореактивную тиоэфирную группу. В этом анализе при расщеплении C4 при участии MASP-2 тиоэфирная группа на C4b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминокислотными группами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает обнаружение C4b методом ИФА.

Эти исследования наглядно демонстрируют создание высокоаффинных Fab2 для крысиного белка MASP-2, которые функционально блокируют активность как C4-, так и C3-конвертазы, тем самым предотвращая активацию лектинового пути.

#### Пример 11.

В этом примере описано картирование эпитопов нескольких блокирующих антикрысиных MASP-2 антител Fab2, полученных описанным в примере 10 способом.

#### Методы.

Как показано на фиг. 10, следующие белки все с N-терминальными 6X His метками экспрессировались в клетках CHO с помощью вектора pED4:

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

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

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

CUBI/EGF-подобный, N-терминальные фрагменты крысиного MASP-2, которые содержат только CUBI и EGF-подобный домены.

Эти белки очищали из культуральных супернатантов никель-аффинной хроматографией, как было

описано ранее (Chen et al., J. Biol. Chem., 276:25894-02 (2001)).

С-терминальный полипептид (ССРІІ-SP), содержащий ССРІІ и домен сериновой протеазы крысиного MASP-2, экспрессировали в E.coli в виде слитого с тиоредоксином белка с помощью pTrxFus (Invitrogen). Белок очищали от клеточных лизатов с помощью аффинной смолы Thiobond. Слитый с тиоредоксином белок экспрессировали в пустом pTrxFus в качестве отрицательного контроля.

Все рекомбинантные белки подвергали диализу в буфере TBS и их концентрации определили путем измерения OD при 280 nm.

Дот-блот анализ.

Серийное разведение пяти рекомбинантных полипептидов MASP-2, описанных выше и показанных на фиг. 10 (и полипептид тиоредоксина в качестве отрицательного контроля для полипептида ССРІІ-сериновой протеазы), наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Количество наносимого белка находилось в диапазоне от 100 нг до 6,4 пг, в пятикратных разведениях. В последующих экспериментах, количество наносимого белка находилось в диапазоне от 50 нг до 16 пг, также в пятикратных разведениях. Мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в TBS (блокирующий буфер), затем инкубировали с 1,0 мкг/мл анти-MASP-2 Fab2 в блокирующем буфере (содержащем 5,0 mM Ca<sup>2+</sup>). Связанные Fab2 определяли, используя HRP-конъюгированное античеловеческое Fab (AbD/Serotec; разведенное в соотношении 1/10000) и набор для обнаружения ECL (Amersham). Одну мембрану инкубировали с поликлональным кроличьим античеловеческим MASP-2 Ab (описанным у Stover et al., J. Immunol., 163:6848-59 (1999)) в качестве положительного контроля. В этом случае связанное Ab детектировали с помощью HRP-конъюгированного козлиного антикроличьего IgG (Dako; разведенного в соотношении 1/2000).

Анализ связывания MASP-2.

Планшеты ИФА покрывали рекомбинантным MASP-2A или полипептидом CUBI-II 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 серийные разведения анти-MASP-2 Fab2 в TBS, содержащем 5,0 mM Ca<sup>2+</sup>. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После тройной промывки TBS/Твин/Ca<sup>2+</sup>, добавляли HRP-конъюгированное античеловеческое Fab (AbD/Serotec), разведенное в соотношении 1/10000 в TBS/Ca<sup>2+</sup>, и планшеты снова инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанное антитело детектировали с помощью набора TMB, субстрата пероксидазы (Biorad).

Результаты.

Результаты дот-блот анализа, демонстрирующие реакционную способность Fab2 по отношению к различным полипептидам MASP-2, представлены ниже в табл. 7. Численные значения, приведенные в табл. 7, обозначают количество наносимого белка, необходимое для получения сигнала с интенсивностью примерно 1/2 от максимального значения. Как можно видеть, положительное контрольное Ab (сыворотка поликлонального античеловеческого MASP-2, полученная от кроликов) распознавало все полипептиды (исключение составляет только химерный белок тиоредоксина).

Таблица 7

Реакционная способность по отношению к различным рекомбинантным полипептидам крысиного masp-2 в дот-блот анализе

| № антитела<br>Fab2 | MA SP-2A | CUBI-II | CUBI/EGF-<br>подобный | CCP II-<br>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 |

NR=нет реакции.

Положительное контрольное антитело представляет собой сыворотку поликлонального античеловеческого MASP-2, полученную от кроликов.

Все Fab2 вступали в реакцию с MASP-2A, а также с MASP-2K (данные не показаны). Большинство Fab2 распознавали полипептид CCP-II-SP, но не N-терминальные фрагменты. Исключения представляют Fab2 № 60 и Fab2 № 57. Fab2 № 60 распознает MASP-2A и фрагмент CUBI-II, но не распознает CUBI/EGF-подобный полипептид или CCP-II-SP полипептид, что предполагает его связывание с эпитопом на CUBI, или перекрытие CUBI и EGF-подобного домена. Fab2 № 57 распознает MASP-2A, при этом не распознает ни один из протестированных фрагментов MASP-2, что указывает на то, что это антитело Fab2 распознает эпитоп на CCP-I. Fab2 № 40 и 49 связываются только с полным MASP-2A. В анализе связывания ИФА, показанном на фиг. 11, Fab2 № 60 также связывался с полипептидом CUBI-II, хотя с несколько более низким кажущимся сродством.

Эти результаты демонстрируют уникальную способность Fab2 блокировать многочисленные участки белка MASP-2.

Пример 12.

В этом примере описана идентификация с помощью фагового дисплея полностью человеческих scFv-антител, которые связываются с MASP-2 и подавляют опосредуемую лектином активацию комплемента, при этом не затрагивая классический (C1q-зависимый) путь компонента иммунной системы.

Краткий обзор.

Полностью человеческие, высокоаффинные антитела MASP-2 идентифицировали путем скрининга библиотеки фагового дисплея. Фрагменты вариабельных участков легкой и тяжелой цепей антител выделяли как в формате scFv, так и в формате полноразмерного IgG. Человеческие антитела к MASP-2 являются полезными для подавления клеточного повреждения, ассоциированного с опосредованной лектином активацией пути комплемента, при этом не затрагивая классический (C1q-зависимый) путь компонента иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления представленные ингибирующие MASP-2 антитела имеют следующие характеристики:

- (а) высокое сродство к человеческому MASP-2 (например,  $K_D=10$  нМ или менее); и
- (б) подавляют MASP-2-зависимую активность комплемента в 90%-ной человеческой сыворотке с  $IC_{50}$ , равной 30 нМ или менее.

Методы.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующую человеческий полипептид MASP-2 с лидерной последовательностью (SEQ ID NO: 5), субклонировали в вектор экспрессии pCI-Neo млекопитающих (Promega), который запускает экспрессию у эукариот под управлением CMV энхансерной/промоторной области (описано у Kaufman R.J. et al., Nucleic. Acids. Research., 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:531-66 (1991)).

Для получения каталитически неактивного человеческого белка MASP-2A осуществляли сайт-направленный мутагенез, как описано в US 2007/0172483, включенном в настоящее описание в виде ссылки. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и получения полос, и получали одиночные аденозиновые перекрытия с помощью стандартной процедуры наращивания. Затем MASP-2A с добавленным аденозином клонировали в вектор pGEM-T Easy, и трансформировали в E.coli. Человеческий MASP-2A дополнительно субклонировали в вектор экспрессии млекопитающих pED или pCI-Neo.

Вышеописанную экспрессионную конструкцию MASP-2 и MASP-2A трансфицировали в клетки

DXB1, используя стандартную процедуру кальций-фосфатной трансфекции (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной питательной среде, чтобы исключить контаминацию препаратов другими сывороточными белками. Через день собирали конфлюэнтные клетки из питательных сред (в общей сложности процесс проводили четыре раза). Средний уровень рекомбинантного MASP-2A составил примерно 1,5 мг/л культуральной среды. MASP-2A (мутантную форму Ser-Ala, описанную выше) очищали аффинной хроматографией на колонках с MBP-A-агарозой.

Метод ИФА для MASP-2A на клонах-кандидатах scFv, идентифицированных путем пэннинга/scFv преобразования и скрининга с помощью фильтра.

Библиотеку фагового дисплея последовательностей варьируемых участков легкой и тяжелой цепей человеческого иммуноглобулина подвергали антигенному пэннингу с последующим автоматизированным скринингом и отбором для выявления высокоаффинных scFv-антител к человеческому белку MASP-2. Выполняли три цикла пэннинга scFv-фаговой библиотеки относительно HIS-метки или меченого биотином MASP-2A. В третьем цикле пэннинга выполняли элюцию сначала с MBL, а затем с TEA (щелочным). Для отслеживания специфического обогащения фагов, демонстрирующих фрагменты scFv относительно целевого MASP-2A выполняли ИФА для поликлональных фагов против иммобилизованного MASP-2A. Гены scFv из цикла 3 пэннинга клонировали в вектор экспрессии pHOG и выполняли скрининг через мелкий фильтр для поиска конкретных клонов нацеленных на MASP-2A.

Бактериальные колонии, содержащие плазмиды, кодирующие scFv-фрагменты из цикла 3 пэннинга, собирали, помещали на нитроцеллюлозные мембраны и выращивали в течение ночи на неиндуцирующей среде для получения мастер-планшетов. В общей сложности было отобрано и проанализировано 18000 колоний из цикла 3 пэннинга, половина в результате конкурентной элюции и половина в результате последующей элюции ТЭА. Пэннинг библиотеки фagemидных scFv против MASP-2A с последующим scFv-преобразованием и скринингом с использованием фильтра дал 137 положительных клонов. 108/137 клонов оказались положительными в анализе ИФА в отношении связывания MASP-2 (данные не показаны), из которых 45 клонов были дополнительно проанализированы на способность блокировать активность MASP-2 в нормальной человеческой сыворотке.

Анализ для измерения подавления образования C3-конвертазы лектинового пути.

Функциональный анализ по измерению подавления образования C3-конвертазы лектинового пути использовали для оценки "блокирующей активности" scFv-клонов-кандидатов MASP-2. Для получения двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержат C3-конвертазу лектинового пути, требуется активность сериновой протеазы MASP-2. Следовательно, scFv MASP-2, которые подавляют функциональную активность MASP-2 (т.е. блокируют scFv MASP-2), будут подавлять de novo образование C3-конвертазы лектинового пути. C3 содержит в своей структуре необычную и высокореактивную тиоэфирную группу. При расщеплении C3 C3-конвертазой в этом анализе тиоэфирная группа на C3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминоклассами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает обнаружение C3b методом ИФА.

Дрожжевой маннан известен как активатор лектинового пути. В следующем методе измерения образования C3-конвертазы пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали с разбавленной человеческой сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали на наличие C3b, иммобилизованного в лунках, стандартными методами ИФА. Количество C3b, образованного в этом анализе, является прямым отражением de novo образования C3-конвертазы лектинового пути. scFv-клоны MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе на способность подавлять образование C3-конвертазы и последующего образования C3b.

Методы.

45 клонов-кандидатов, идентифицированных, как описано выше, экспрессировали, очищали и разбавляли до одной и той же маточной концентрации, которую снова разбавляли буфером GVB, содержащим  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  (4,0 mM барбитала, 141 mM NaCl, 1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4), для гарантии того, что все клоны имеют одинаковое количество буфера. scFv-клоны тестировали в трех повторах в концентрации 2 мкг/мл. Положительным контролем служил OMS100 Fab2, который тестировали при концентрации 0,4 мкг/мл. Образование C3c отслеживали в присутствии и в отсутствие scFv/IgG клонов.

Маннан разбавляли до концентрации 20 мкг/мл (1 мкг/лунку) в 50 mM карбонатном буфере (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ +35 mM  $\text{NaHCO}_3$ +1,5 mM  $\text{NaN}_3$ ), pH 9,5, и покрывали им планшеты ИФА, оставляя на ночь при 4°C. На следующий день покрытые маннаном планшеты промывали 3 раза 200 мкл PBS. Затем в лунки добавляли по 100 мкл 1% блокирующего HSA раствора и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 200 мкл PBS и хранили на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Обычную человеческую сыворотку разбавляли до 0,5% концентрации в буфер CaMgGVB, и в этот буфер добавляли scFv-клоны или положительный контроль OMS100 Fab2 тремя повторами в концентрациях 0,01, 1 мкг/мл (только контроль OMS100) и 10 мкг/мл и предварительно инкубировали в течение 45 мин на льду перед добавлением в заблокированный планшет ИФА. Реакцию инициировали инкубаци-

ей в течение 1 ч при 37°C, которую останавливали путем переноса планшетов на ледяную баню. Отложение C3b детектировали с помощью кроличьего антитела к  $\alpha$ -мышинному C3с, после которого использовали HRP-конъюгированное козьиное анти- $\alpha$ -кроличье антитело. Отрицательным контролем служил буфер без антител (без антител=максимальный уровень отложений C3b), а положительным контролем служил буфер с ЭДТА (без отложения C3b). Фон определяли, используя тот же анализ, за исключением того, что лунки не содержали маннан. Фоноый сигнал относительно планшетов без маннана вычитали из сигналов в маннаноcодержащих лунках. Критерий порогового значения устанавливали равным половине активности нерелевантного scFv-клона (VZV) и чистого буфера.

Результаты. Основываясь на критерии порогового значения, в общей сложности было обнаружено 13 клонов, блокирующих активность MASP-2. Все 13 клонов, обеспечивающих >50% подавления пути, отбирали и секвенировали, получив 10 уникальных клонов. Было найдено, что все десять клонов имеют легкую цепь одного и того же подкласса,  $\lambda$ 3, но тяжелую цепь трех разных подклассов: VH2, VH3 и VH6. В функциональном анализе у пяти из десяти scFv-клонов-кандидатов значения IC<sub>50</sub> в нМ были меньше целевого критерия, 25 нМ с применением 0,5% человеческой сыворотки.

Для выявления антител с улучшенной эффективностью, три материнских scFv-клона, определенных, как описано выше, подвергали методу перетасовки легкой цепи. Этот процесс включал создание комбинаторной библиотеки, состоящей из V<sub>H</sub> каждого материнского клона, спаренного с библиотекой нативных человеческих легких лямбда-цепей (V<sub>L</sub>), полученных от шести здоровых доноров. Затем эту библиотеку подвергали скринингу на выявление scFv-клонов с улучшенным средством связывания и/или функциональностью.

Таблица 8

Сравнение функциональной эффективности по IC<sub>50</sub> (нМ) основных дочерних клонов и соответствующих им материнских клонов (все в формате scFv)

| scFv-клон           | 1%<br>человеческая<br>сыворотка,<br>анализ C3<br>(IC <sub>50</sub> нМ) | 90%<br>человеческая<br>сыворотка,<br>анализ C3<br>(IC <sub>50</sub> нМ) | 90%<br>человеческая<br>сыворотка,<br>анализ C4<br>(IC <sub>50</sub> нМ) |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 17D20mc             | 38                                                                     | Nd                                                                      | Nd                                                                      |
| 17D20m_d3521N1<br>1 | 26                                                                     | >1000                                                                   | 140                                                                     |
| 17N16mc             | 68                                                                     | Nd                                                                      | Nd                                                                      |
| 17N16m_d17N9        | 48                                                                     | 15                                                                      | 230                                                                     |

Ниже представлены последовательности переменного участка тяжелой цепи (VH) для материнских клонов и дочерних клонов, показанных выше в табл. 8.

CDR (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) по Kabat выделены полужирным шрифтом; и CDR (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3)) по Chothia подчеркнуты.

Переменный участок тяжелой цепи (VH) 17D20\_35VH-21N11VL (SEQ ID NO: 67, кодированной SEQ ID NO: 66).

QVTLKESGPVLVKPTETLTTLCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK

SYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARIRRGIDYWGQGLTVTVSS

Переменный участок тяжелой цепи (VH) d17N9 (SEQ ID NO: 68).

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSTSAAWNWIWIRQSPRGLEWLGRTYYRSKW

YNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPFGVPFDIWGQGTMTVTVSS

Ниже представлены последовательности переменного участка легкой цепи (VL) для материнских клонов и дочерних клонов, показанных выше в табл. 8.

CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2); и 89-97 (L3)) по Kabat выделены полужирным шрифтом; и CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) Chothia подчеркнуты. Эти участки являются одинаковыми независимо от системы нумерации по Kabat или Chothia.

Переменный участок легкой цепи (VL) 17D20m\_d3521N11 1 (SEQ ID NO: 69, кодированной SEQ ID NO: 70).

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKORPSGIP

RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL

Переменный участок легкой цепи (VL) 17N16m\_d17N9 (SEQ ID NO: 71).

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPQGAPVLVIYDSDSRPSCIPD

RFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHVFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

Анти-MASP-2 антитела OMS100 и MoAb\_d3521N11VL (содержащие переменный участок тяже-

лой цепи, представленный в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 69, также называемые "OMS646" и "mAb6"), оба продемонстрировавшие связывание человеческого MASP-2 с высоким сродством и имеющие способностью блокировать функциональную активность комплемента, проанализировали относительно связывания эпитопа с помощью дот-блот анализа. Результаты показывают, что антитела OMS646 и OMS100 являются высокоспецифичными по отношению к MASP-2 и не связываются с MASP-1/3. Ни одно антитело, связанное с MAb19 или фрагментами MASP-2, не содержало домен CCP1 MASP-2, что позволило заключить, что участки связывания включают CCP1.

Было определено, что анти-MASP-2-антитело OMS646 активно связывается с рекомбинантным MASP-2 ( $K_d$  от 60 до 250 мкМ) с селективностью, превышающей в 5000 раз таковую для связывания C1s, C1r или MASP-1 (см. табл. 9 ниже).

Таблица 9  
Сродство связывания и специфичность взаимодействия анти-MASP-2 антитела OMS646 с MASP-2, по результатам твердофазного ИФА

| Антиген                    | $K_D$ (пМ) |
|----------------------------|------------|
| MA SP-1                    | >500,000   |
| MA SP-2                    | 62±23*     |
| MA SP-3                    | >500,000   |
| Очищенный человеческий C1r | >500,000   |
| Очищенный человеческий C1s | ~500,000   |

\* Среднее значение±SD; n=12.

OMS646 специфически блокирует компоненты лектинзависимой активации.

Методы.

Влияние OMS646 на отложение мембраноатакующего комплекса (MAC) проанализировали, используя специфические условия для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. С этой целью использовали набор для скрининга комплемента Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Результаты.

На фиг. 12А графически показан уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии анти-MASP-2 антитела (OMS646) в специфических для лектинового пути условиях. На фиг. 12В графически показан уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии анти-MASP-2 антитела (OMS646) в специфических для классического пути условиях. На фиг. 12С графически показан уровень отложения MAC в присутствии или отсутствии анти-MASP-2 антитела (OMS646) в специфических для альтернативного пути условиях.

Как показано на фиг. 12А, OMS646 блокирует опосредованную лектином активацию отложения MAC со значением IC<sub>50</sub>, равным примерно 1 нМ. Однако OMS646 не влиял на отложение MAC, происходящее в результате активации, опосредованной классическим путем (фиг. 12В) или альтернативным путем (фиг. 12С).

Фармакокинетика и фармакодинамика OMS646 после внутривенного (IV) или подкожного (SC) введения мышам

Фармакокинетику (PK) и фармакодинамику (PD) OMS646 оценивали в 28-дневном исследовании PK/PD у мышей при однократном введении дозы. В исследовании тестировали уровни доз 5 и 15 мг/кг OMS646, вводимых подкожно (SC), а также уровень дозы 5 мг/кг OMS646, вводимой внутривенно (IV).

Что касается PK-профиля OMS646, на фиг. 13 графически показана концентрация OMS646 (среднее количество животных n=3 на группу) в зависимости от времени после введения OMS646 в указанной дозе. Как показано на фиг. 13, при 5 мг/кг SC максимальная концентрация OMS646 в плазме, равная 5-6 мкг/мл, была достигнута примерно через 1-2 дня после дозирования. Биодоступность OMS646 при 5 мг/кг SC составляла примерно 60%. На фиг. 13 также показано, что при 15 мг/кг SC максимальная концентрация в плазме OMS646, равная 10-12 мкг/мл, была достигнута примерно через 1-2 дня после дозирования. Во всех группах OMS646 медленно выводился из системного кровотока с конечным периодом полураспада примерно 8-10 дней. Профиль OMS646 оказался типичным для человеческих антител у мышей.

PD активность OMS646 графически показана на фиг. 14А и 14В. На фиг. 14А и 14В показан ответ PD (снижение системной активности лектинового пути) для каждой мыши в группах, получивших 5 мг/кг IV (фиг. 14А) и 5 мг/кг SC (фиг. 14В). Пунктирная линия указывает исходный уровень в анализе (максимальное подавление, интактная мышьяная сыворотка, инъецированная *in vitro* с избытком OMS646 перед анализом). Как показано на фиг. 14А, после IV введения 5 мг/кг OMS646 активность лектинового пути системы комплемента сразу снизилась почти до необнаружимых уровней, а восстановление активности лектинового пути в течение 28-дневного периода наблюдения было умеренным. Как показано на фиг. 14В, у мышей, получивших дозу 5 мг/кг OMS646 SC, наблюдалось зависимое от времени подавление

ние активности лектинового пути. Активность лектинового пути снижалась до почти необнаруживаемых уровней в течение 24 ч после введения лекарственного вещества и оставалась на низком уровне в течение по меньшей мере 7 дней. Активность лектинового пути постепенно увеличивалась со временем, но не возвращалась к уровням, наблюдаемым до введения дозы, в течение 28-дневного периода наблюдения. Профиль активности лектинового пути в зависимости от времени, наблюдаемый после введения 15 мг/кг SC, был аналогичным профилю для дозы 5 мг/кг SC (данные не показаны), что указывает на насыщение конечной точки PD. Данные также указывают на то, что дозы 5 мг/кг OMS646, вводимые раз в неделю либо IV, либо SC, являются достаточными для достижения непрерывного подавления активности лектинового пути системы комплемента у мышей.

#### Пример 13.

В этом примере описана получение рекомбинантных антител, которые ингибируют MASP-2, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащий один или более CDR, которые специфически связываются с MASP-2, и по меньшей мере одну ядерную пептидную последовательность SGMI (также называемых анти-MASP-2 антителом, несущее SGMI-пептид, или его антигенсвязывающий фрагмент).

#### Предпосылки/обоснование.

Создание специфических ингибиторов MASP-2, называемых SGMI-2, описана у Heja et al., J. Biol. Chem., 287:20290 (2012); и Heja et al., PNAS, 109:10498 (2012), каждый из которых включен в настоящее описание в виде ссылки. SGMI-2 представляет собой пептид из 36 аминокислот, который был выбран из фаговой библиотеки вариантов ингибитора 2 протеазы *Schistosoma gregaria*, в котором шесть из восьми положений связывающей протеазу петли были полностью рандомизированы. Последующая эволюция *in vitro* давала в результате моносpezifические ингибиторы с одноразрядными значениями  $K_i$  в нМ диапазоне (Heja et al., J. Biol. Chem., 287:20290, 2012). Структурные исследования показали, что оптимизированная связывающая протеазу петля образует первичный участок связывания, который определяет специфичность двух ингибиторов. Аминокислотные последовательности удлиненных вторичных и внутренних связывающих участков являются общими для обоих ингибиторов и вносят вклад в участок контакта (Heja et al., 2012, J. Biol. Chem., 287:20290). Механически SGMI-2 блокирует активацию лектинового пути комплемента, не влияя на классический путь (Heja et al., 2012, Proc. Natl. Acad. Sci., 109:10498).

Аминокислотные последовательности ингибиторов SGMI-2 приведены ниже.

SGMI-2L, полноразмерный: LEVTCEPGTTFKDKNCTCRGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO: 72).

SGMI-2L, средней длины: TCEPGTTFKDKNCTCRGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO: 73).

SGMI-2L, короткий: TCRGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO: 74).

Как описано в этом примере, а также в WO 2014/144542, анти-MASP-2 антитела, несущие пептид SGMI-2, и их фрагменты, получали путем слияния с аминокислотной последовательностью пептида SGMI-2 (SEQ ID NO: 72, 73 или 74) на amino или карбоксильном конце тяжелой и/или легкой цепи человеческого анти-MASP-2 антитела. Анти-MASP-2 антитела, несущие пептид SGMI-2, и их фрагменты имеют повышенную ингибирующую активность по сравнению с анти-MASP-2 антителом с обнаженным остовом, которое не содержит пептидную последовательность SGMI-2, согласно результатам анализа отложения C3b или C4b с использованием человеческой сыворотки, как описано в WO 2014/144542, а также имеют повышенную ингибирующую активность по сравнению с анти-MASP-2 антителом с обнаженным остовом, измеренную в мышинной модели *in vivo*. Способы получения анти-MASP-2 антитела, несущего пептид SGMI-2, описаны ниже.

#### Методы.

Получали экспрессионные конструкции для кодирования четырех иллюстративных анти-MASP-2 антител, несущих пептид SGMI-2, где пептид SGMI-2 был слит либо с N- или C-концом тяжелой или легкой цепи репрезентативного ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 (как описано в примере 12).

Таблица 10

Слияния MASP-2 антитела/SGMI-2

| Антитело<br>сравнения             | Расположение пептида на антителе |        |        |        | SEQ ID<br>NO: |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------|--------|--------|---------------|
|                                   | H-N                              | H-C    | L-N    | L-C    |               |
| HL-M2<br>(голое MASP-2<br>OMS646) | -                                | -      | -      | -      | 67+70         |
| H-M2-SGMI-2-N                     | SGMI-2                           | -      | -      | -      | 75+70         |
| H-M2-SGMI-2-C                     | -                                | SGMI-2 | -      | -      | 76 +70        |
| L-M2-SGMI-2-N                     | -                                | -      | SGMI-2 | -      | 67+ 77        |
| L-M2-SGMI-2-C                     | -                                | -      | -      | SGMI-2 | 67+ 78        |

Обозначения в табл. 10.

"H-N"=аминоконец тяжелой цепи.



"Н-С"=карбоксильный конец тяжелой цепи.

"L-N"=аминоконец легкой цепи.

"L-С"=карбоксильный конец легкой цепи.

"M2"=остов MASP-2 ab (OMS646).

Для N-концевых слияний, показанных в табл. 10, добавляли пептидный линкер ('GTGGGGGGSS' SEQ ID NO: 79) между пептидом SGMI-2 и варибельным участком.

Для С-концевых слияний, показанных в табл. 10, добавляли пептидный линкер ("AAGGSG" SEQ ID NO: 80) между константной областью и пептидом SGMI-2, а второй пептид "GSGA" (SEQ ID NO: 81) добавляли на С-конце слитого полипептида для защиты С-концевых пептидов SGMI-2 от деградации.

Аминокислотные последовательности приведены ниже для следующих репрезентативных слияний MASP-2 антитело/SGMI-2.

Н-M2ab6-SGMI-2-N (SEQ ID NO: 75, кодированная SEQ ID NO: 82):

LEVTCCEPGTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQVTLKESGPVLVK  
PTETLTTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSK  
NQVVLTMNTMDPVDATATYYCARIRRGIDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDH  
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP  
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKT  
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

[491 aa белок, aa 1-36=SGMI-2 (подчеркнуто), aa 37-46=линкер (выделен курсивом);

aa 47-164=варибельный участок тяжелой цепи MASP-2 ab № 6 (подчеркнуто);

aa 165-491=IgG4 константный участок с мутацией в шарнирной области.]

Н-M2ab6-SGMI-2-C (SEQ ID NO: 76, кодированная SEQ ID NO: 83):

QVTLKESGPVLVKPTETLTTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK  
SYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMNTMDPVDATATYYCARIRRGIDYWGQGLTVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGL  
 GKAAGGSGLEVTCCEPGTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[491aa белок, aa 1-118=варибельный участок тяжелой цепи MASP-2 ab № 6 (подчеркнуто);

aa 119-445=IgG4 константный участок с мутацией в шарнирной области;

aa 446-451=первый линкер (выделено курсивом);

aa 452-487=SGMI-2;

aa 488-491=второй линкер (выделено курсивом).]

L-M2ab6-SGMI-2-N (SEQ ID NO: 77, кодируемая SEQ ID NO: 84):

LEVTCCEPGTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQPVLTQPPSLSVS  
PGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQOKPGQSPVLVYQDKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT  
QAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP  
 GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT  
 VAPTECS

[258 aa белок, aa 1-36=SGMI-2 (подчеркнуто);

aa 37-46=линкер (выделено курсивом);

aa 47-152=варибельный участок легкой цепи MASP-2 ab № 6 (подчеркнуто);

aa 153-258=константный участок человеческого Ig лямбда.]

L-M2ab6-SGMI-2-C (SEQ ID NO: 78, кодируемая SEQ ID NO: 85):

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQOKPGQSPVLVYQDKQRPSGIPE  
RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE  
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS  
HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSAAGGSGLEVTCCEPGTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLW  
CNQGSGA

[258 aa белок, aa 1-106=варибельный участок легкой цепи MASP-2 ab № 6 (подчеркнуто);

aa 107-212=константный участок человеческого Ig лямбда;

aa 213-218=первый линкер;  
 aa 219-254=SGMI-2;  
 aa 255-258=второй линкер.]  
 Функциональный анализ.

Четыре конструкции анти-MASP-2-SGMI-2 слитого антитела транзиечно экспрессировали в клетках Expi293F (Invitrogen), очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А и тестировали в 10% нормальной человеческой сыворотке для подавления отложения C3b в анализе с микросферами, покрытыми маннаном, как описано ниже.

Тестирование MASP-2-SGMI-2 слияний в анализе отложения C3b с использованием микросфер, покрытых маннаном.

MASP-2-SGMI-2 слитые антитела оценивали на способность подавлять лектиновый путь в анализе отложения C3b на покрытых маннаном микросферах. Этот анализ, который позволяет определить степень активности методом проточной цитометрии, имеет более высокое разрешение, чем анализ Wieslab®. Анализ лектинового пути с использованием микросфер выполняли следующим образом: маннан адсорбировали на полистирольных микросферах диаметром 7 мкм (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA) в течение ночи при 4°C в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Микросферы промывали PBS и подвергали воздействию 10% человеческой сыворотки или 10% сыворотку предварительно инкубировали с антителами или ингибиторами. Смесь сыворотка-микросферы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при перемешивании. После инкубации в сыворотке микросферы промывали, и отложение C3b на микросферах измеряли путем обнаружения с помощью анти-C3c поликлонального кроличьего антитела (Dako North America, Carpinteria, CA, USA) и PE-Cy5-конъюгированного козьего антикроличьего вторичного антитела (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). После процедуры окрашивания микросферы анализировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur. Микросферы анализировали в виде однородной популяции, используя прямое и боковое рассеяние, и отложение C3b проявлялось в виде FL3-положительных частиц (FL-3 или "FL-3-канал" указывают на третий или красный канал на цитометре). Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (MFI) для популяции для каждого экспериментального состояния выводили на графике зависимости от концентрации антитело/ингибитор для оценки подавления лектинового пути.

Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM. В частности, значения IC<sub>50</sub> получали путем применения нелинейной (четырёх параметрической), с изменяемым углом наклона подгонкой кривых зависимости log (антитело) от средней интенсивности флуоресценции, полученных в результате цитометрического анализа.

Результаты показаны в табл. 11.

Таблица 11

Отложение C3b (анализ с использованием покрытых маннаном микросфер) в 10% человеческой сыворотке

| Конструкция           | IC <sub>50</sub> (нМ) |
|-----------------------|-----------------------|
| ab с голым N2 (mAb#6) | ≥ 3,63 нМ             |
| H-M2-SGMI-2-N         | 2,11 нМ               |
| L-M2-SGMI-2-C         | 1,99 нМ               |
| H-M2-SGMI-2-N         | 2,24 нМ               |
| L-M2-SGMI-2-N         | 3,71 нМ               |

Результаты.

Контрольное, не содержащее SGMI анти-MASP-2 антитело с "голым" остовом (mAb № 6), оказалось ингибирующим в этом анализе с величиной IC<sub>50</sub>≥3,63 нМ, что согласуется с результатами ингибирования, наблюдаемыми в примере 12. Примечательно то, что, как показано в табл. 11, все слияния SGMI-2-MASP-2 антитело, которые были протестированы, улучшали эффективность антитела MASP-2-остов в этом анализе, что указывает на то, что повышенная валентность также может быть полезной при подавлении отложения C3b.

Тестирование слияний MASP-2-SGMI-2 в анализе с покрытыми маннаном микросферами для изучения отложения C4b с 10% человеческой сывороткой.

Анализ отложения C4b проводили с использованием 10% человеческой сыворотки в тех же условиях анализа, которые описаны выше для анализа отложения C3b, со следующими модификациями. Анализ для обнаружения C4b и анализ проточной цитометрии проводили путем окрашивания реакции отложения анти-C4b мышинным моноклональным антителом (1:500, Quidel) и путем окрашивания вторичным козьим антимышиным F(ab')<sub>2</sub>, конъюгированным с PE-Cy5 (1:200, Southern Biotech), перед анализом проточной цитометрии.

Результаты.

Оба слияния SGMI-2-несущее анти-MASP-2-N-терминальное антитело (H-M2-SGMI-2-N:

IC<sub>50</sub>=0,34 нМ, L-M2-SGMI-2-N: IC<sub>50</sub>=0,41 нМ) имели повышенную эффективность по сравнению с анти-телом анти-MASP-2-остов (HL-M2: IC<sub>50</sub>=0,78 нМ).

Аналогичным образом слияния одиночное SGM-2-несущее C-терминальное анти-MMS-2-антитело (H-M2-SGMI-2-C: IC<sub>50</sub>=0,45 нМ и L-M2-SGMI-2C: IC<sub>50</sub>=0,47 нМ) имели повышенную активность по сравнению с антителом анти-MASP-2-остов (HL-M2: IC<sub>50</sub>=1,2 нМ).

Тестирование слияний MASP-2-SGMI-2 в анализе отложения C3b с покрытыми маннаном микросферами с 10% мышинной сывороткой

Анализ отложения C3b с покрытыми маннаном микросферами осуществляли, как описано выше, с 10% мышинной сывороткой. Аналогично результатам, наблюдаемым в случае использования человеческой сыворотки, было установлено, что в мышинной сыворотке слияния SGMI-2-несущие анти-MASP-2 обладают повышенной эффективностью по сравнению с антителом анти-MASP-2-остов.

Краткий обзор результатов. Результаты в этом примере демонстрируют, что все слияния SGMI-2-MASP-2 антитела, которые были протестированы, улучшали эффективность антитела анти-MASP-2-остов.

Пример 14.

В этом примере представлены результаты, полученные с использованием модели фиброза почек на фоне односторонней обструкции мочеточника (UUO) у MASP-2-/- дефицитных и MASP-2+/+ достаточных мышей для оценки роли лектинового пути при фиброзе почек.

Предпосылки/обоснование.

Фиброз почек и воспаление являются характерными признаками поздней стадии заболевания почек. Тубулоинтерстициальный фиброз почек представляет собой прогрессирующий процесс, включающий устойчивое повреждение клеток, аберрантное заживление, активацию резидентных и инфильтрирующих клеток почек, высвобождение цитокинов, воспаление и фенотипическую активацию клеток почек для продуцирования внеклеточного матрикса. Тубулоинтерстициальный (ТИ) фиброз почек является общей терминальной точкой множественных патологий почек и представляет собой ключевую цель для потенциальных методов лечения, направленных на предотвращение прогрессирующего функционального нарушения почек при хроническом заболевании почек (ХЗП). Почечная ТИ недостаточность тесно связана со снижением функции почек при гломерулярных заболеваниях (Risdon RA et al., *Lancet*, 1:363-366, 1968; Schainuck L.I. et al., *Hum. Pathol.*, 1:631-640, 1970; Nath K.A., *Am. J. Kid. Dis.*, 20:1-17, 1992) и характерна для ХЗП, при котором происходит накопление миофибробластов, а потенциальное пространство между канальцами и перитубулярными капиллярами забивается матриксом, состоящим из коллагенов и других протеогликанов. Вопрос происхождения ТИ миофибробластов остается весьма противоречивым, но фиброзу обычно предшествует воспаление, которое первоначально характеризуется ТИ-накоплением Т-лимфоцитов, а затем макрофагов (Liu Y. et al., *Nat. Rev. Nephrol.*, 7:684-696, 2011; Duffield J.S., *J. Clin. Invest.*, 124:2299-2306, 2014).

Модель UUO грызунов генерирует прогрессирующий фиброз почек, отличительный признак прогрессирующего заболевания почек практически любой этиологии (Chevalier et al., *Kidney International*, 75:1145-1152, 2009). Имеются сообщения об увеличенной экспрессии гена C3 у мышей дикого типа после UUO и значительном уменьшении отложений коллагена у C3-/- нокаутных мышей после UUO по сравнению с мышами дикого типа, что указывает на роль активации комплемента при фиброзе почек (Fearn et al., *Mol. Immunol.*, 48:1666-1733, 2011). Имеется также сообщение, что дефицит C5 приводил к значительному ослаблению основных компонентов фиброза почек в модели тубулоинтерстициального поражения (Boor P. et al., *J. of Am. Soc. of Nephrology*, 18:1508-1515, 2007). Однако до описанного в настоящей заявке исследования, выполненного авторами изобретения, конкретные компоненты комплемента, участвующие в фиброзе почек, не были четко определены. Таким образом, было проведено следующее исследование для оценки MASP-2 (-/-) и MASP-2 (+/+) мышей в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO).

Методы.

Получали MASP-2-/- мыш, как описано в примере 1, и подвергали обратному скрещиванию в течение 10 поколений с C57BL/6. Мышей дикого типа (WT) C57BL/6 и гомозиготных MASP-2-дефицитных (MASP-2-/-) мышей на фоне C57BL/6 содержали в стандартизованных условиях с циклом день/ночь - 12/12, при этом мышей кормили стандартными пищевыми гранулами, вода и пища находились в свободном доступе. Десятидневных мышей, по 6 на группу, анестезировали 2,5% изофлураном в 1,5 л/мин кислорода. Правые мочеточники в двух группах десятидневных самцов мышей C56/BL6, дикого типа и MASP-2-/- лигировали хирургическим путем. Правую почку обнажали через боковой разрез длиной 1 см. Правый мочеточник полностью блокировали в двух точках, используя полилактиновую нить 6/0. Анестезию осуществляли бупренорфином интраоперационно каждые 12 ч до 5 доз в зависимости от степени боли. Местную анестезию бупивакаином проводили один раз во время операции.

Мышей умерщвляли через 7 дней после операции, а ткани почек собирали, фиксировали и заливали в парафиновые блоки. Кровь собирали у мышей путем сердечной пункции под анестезией, и после нефрэктомии мышей обескровливали. Кровь оставляли на льду для коагуляции на 2 ч, и сыворотку отделяли центрифугированием и хранили в замороженном виде в виде аликвот при -80°C.

Иммуногистохимия ткани почек.

Для измерения степени фиброза в почках по отложению коллагена 5-микронные парафиновые срезы почек окрашивали пикросириусом красным, коллаген-специфические пятна, как описано у Whitaker P. et al., Basic. Res. Cardiol., 89:397-410, 1994. Вкратце срезы почек депарафинировали, регидратировали, и коллаген окрашивали в течение 1 ч водным раствором красным пикросириусом (0,5 г сириуса красного, Sigma, Dorset UK) в 500 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты. Слайды дважды промывали подкисленной водой (0,5% ледяная уксусная кислота в дистиллированной воде) в течение 5 мин каждый раз, затем обезвоживали и готовили препарат для исследования.

Для измерения степени воспаления, о чем свидетельствует инфильтрация макрофагов, срезы почек окрашивали специфическим к макрофагам антителом F4/80 следующим образом. Фиксированные в формалине, залитые парафином, 5-микронные срезы почек депарафинизировали и регидратировали. Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере при 95°C в течение 20 мин с последующим блокированием эндогенной активности пероксидазы путем инкубации в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 мин. Срезы тканей инкубировали в блокирующем буфере (10% инактивированная теплом нормальная козья сыворотка с 1% бычьим сывороточным альбумином в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS)) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим блокированием авидином/биотином. Срезы ткани промывали PBS после каждой стадии по три раза в течение 5 мин. Первичное антитело к макрофагу F4/80 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), разбавленное 1:100 в блокирующем буфере, наносили в течение 1 ч. Затем биотинилированное козье антикрысиное вторичное антитело, разбавленное 1:200, наносили в течение 30 мин с последующим нанесением конъюгированного с пероксидазы хрена (HRP) фермента в течение 30 мин. Цвет окраски проявлялся под воздействием субстрата диаминобензидина (DAB) (Vector Labs, Peterborough UK) в течение 10 мин, слайды промывали в воде, обезвоживали и готовили для исследования без контрастной окраски для упрощения компьютерного анализа.

Анализ изображений.

Процент окрашивания кортикального слоя почек определяли, как описано у Furness P.N. et al., J. Clin. Pathol., 50:118-122, 1997. Вкратце 24-битные цветные изображения брали из последовательных неперекрывающихся полей почечного коркового вещества непосредственно под почечной капсулой вокруг всей периферии среза почки. После каждого захвата изображения использовали NIH изображение для извлечения из него красного канала в виде 8-битного монохромного изображения. Неравномерность фонового освещения вычитали, используя предварительно записанное изображение освещенного поля микроскопа без размещенного на нем среза. Для изображения задавали фиксированный порог для определения области изображения, соответствующей положительной окраске. Затем вычисляли процент черных пикселей, и после того, как все изображения вокруг почки были измерены таким образом, регистрировали средний процент, обеспечивающий значение, соответствующее проценту окрашенной области в срезах почки.

Анализ экспрессии генов.

Экспрессию нескольких генов, имеющих отношение к воспалению почек и фиброзу в почках мыши, измеряли количественной ПЦР (кПЦР) следующим образом. Общую РНК выделяли из почечного коркового вещества с помощью Trizol® (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) согласно инструкциям производителя. Экстрагированную РНК обрабатывали с помощью набора Turbo без ДНК (ThermoFisher Scientific) для устранения загрязнения ДНК, а затем синтезировали первую нить кДНК с помощью AMV системы обратной транскрипции (Promega, Madison, WI, USA). Целостность кДНК подтверждали одной реакцией кПЦР с помощью набора TaqMan GAPDH Assay (Applied Biosystems, Paisley UK) с последующей реакцией кПЦР с использованием 96-луночных планшетов Custom TaqMan Array (Life Technologies, Paisley, UK).

В этом анализе изучали двенадцать генов:

коллаген типа IV альфа 1 (col4a1; ИД анализа: Mm01210125\_m1);  
 трансформирующий фактора роста бета-1 (TGFβ-1; ИД анализа: Mm01178820\_m1);  
 кадгерин 1 (Cdh1; ИД анализа: Mm01247357\_m1);  
 фибронектин 1 (Fn1; ИД анализа: Mm01256744\_m1);  
 интерлейкин 6 (IL6; ИД анализа Mm00446191\_m1);  
 интерлейкин 10 (IL10; ИД анализа Mm00439614\_m1);  
 интерлейкин 12a (IL12a; ИД анализа Mm00434165\_m1);  
 виментин (Vim; ИД анализа Mm01333430\_m1);  
 актинин альфа 1 (Actn1; ИД анализа Mm01304398\_m1);  
 фактор некроза опухоли-α (TNF-α, ИД анализа Mm00443260\_g1);  
 компонент комплемента 3 (C3; ИД анализа Mm00437838\_m1);  
 интерферон-гамма (Ifn-γ; ИД анализа Mm01168134).

Использовали следующие конститутивные контрольные гены:

глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, ИД анализа Mm99999915\_g1);  
 глюкокуронидазы бета (Gusβ; ИД анализа Mm00446953\_m1);

эукариотической 18S рРНК (18S; ИД анализа Hs99999901\_s1);

гипоксантин гуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT; ИД анализа Mm00446968\_m1).

20 мкл реакционных агентов амплифицировали, используя смесь TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems), в течение 40 циклов. Данные амплификации ПЦР в реальном времени анализировали с использованием программного обеспечения Applied Biosystems 7000 SDS v1.4.

#### Результаты.

После односторонней обструкции мочеточника (UUO) в окклюдированных почках наблюдается приток воспалительных клеток, в частности макрофагов, с последующим быстрым развитием фиброза, о чем свидетельствует накопление коллагена наряду с дилатацией трубочек и истончением проксимального трубчатого эпителия (см. Chevalier R.L. et al., *Kidney Int.*, 75:1145-1152, 2009).

На фиг. 15 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным, где участки ткани получали от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника (UUO) и от ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на фиг. 15, участки почек мышей дикого типа через 7 дней после обструкции мочеточника показали значительно большее количество отложений коллагена по сравнению с MASP-2-/- мышами (значение  $p=0,0096$ ). Средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего для UUO оперированных мышей в группах дикого типа и MASP-2 -/- составляли  $24,79 \pm 1,908$  ( $n=6$ ) и  $16,58 \pm 1,3$  ( $n=6$ ) соответственно. Как дополнительно показано на фиг. 15, срезы ткани от ложнооперированных контрольных мышей дикого типа и ложнооперированных контрольных MASP-2-/- мышей показали очень низкие уровни окрашивания коллагена, как и ожидалось.

На фиг. 16 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителами, специфичными к маркеру макрофагов F4/80, где срезы тканей получали от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника или от ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на фиг. 16, по сравнению с мышами дикого типа ткани, полученные из UUO почек MASP-2-/- мышей, показали значительно меньшую инфильтрацию макрофагов через 7 дней после обструкции мочеточника (% площади макрофагов, окрашенной в WT:  $2,23 \pm 0,4$  против MASP-2-/-:  $0,53 \pm 0,06$ ,  $p=0,0035$ ). Как дополнительно показано на фиг. 16, срезы тканей от ложнооперированных мышей дикого типа и ложнооперированных MASP-2-/- мышей не показали обнаруживаемого окрашивания макрофагов.

Анализ экспрессии множества различных генов, связанных с воспалением почек и фиброзом, осуществляли на срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника и от ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей. Данные, показанные на фиг. 17-20, представляют собой  $\text{Log}_{10}$  относительного количества в образце ложнооперированных мышей дикого типа, а планки представляют собой стандартную ошибку среднего. Что касается результатов анализа экспрессии генов, связанных с фиброзом, на фиг. 17 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК коллагена IV типа альфа 1 (коллаген-4), измеренные методом кПЦР в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника и от ложнооперированных контрольных мышей. На фиг. 18 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК трансформирующего фактора роста бета-1 ( $\text{TGF}\beta$ -1), измеренные кПЦР, в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника и от ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на фиг. 17 и 18, окклюдированные почки мышей дикого типа показали значимо увеличенную экспрессию связанных с фиброзом генов коллагена типа IV (фиг. 17) и  $\text{TGF}\beta$ -1 (фиг. 18) по сравнению с ложнооперированными почками у мышей дикого типа, свидетельствующую о том, что эти связанные с фиброзом гены были индуцированы после UUO повреждения у мышей дикого типа, как и ожидалось. Напротив, как дополнительно показано на фиг. 17 и 18, окклюдированные почки MASP-2-/- мышей, подвергнутых UUO повреждению, продемонстрировали значимое снижение экспрессии коллагена типа IV (фиг. 17,  $p=0,0388$ ) и значимое снижение экспрессии  $\text{TGF}\beta$ -1 (фиг. 18,  $p=0,0174$ ) по сравнению с мышами дикого типа, подвергнутыми UUO-повреждению.

Что касается результатов анализа экспрессии генов, связанных с воспалением, то на фиг. 19 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК интерлейкина-6 (IL-6), измеренные кПЦР в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника и от ложнооперированных контрольных мышей. На фиг. 20 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК интерферона- $\gamma$ , измеренные кПЦР, в срезах тканей почек, полученных от мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей через 7 дней после обструкции мочеточника и от ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на фиг. 19 и 20, окклюдированные почки у мышей дикого типа продемонстрировали значимо повышенную экспрессию связанных с воспалением генов интерлейкина-6 (фиг. 19) и интерферона- $\gamma$  (фиг. 20) по сравнению с ложнооперированными почками мышей дикого типа, свидетельствующую о том, что эти связанные с воспалением гены индуцируются после UUO повреждения у мышей дикого типа. Напротив, как дополнительно показано на фиг. 19 и 20, окклюдированные почки MASP-2-/- мышей, подвергнутых UUO поражению, продемонстрировали зна-

чимое снижение экспрессии интерлейкина-6 (фиг. 19,  $p=0,0109$ ) и интерферона- $\gamma$  (фиг. 20,  $p=0,0182$ ) по сравнению с мышами дикого типа, подвергнутыми UUO поражению.

Следует отметить, что экспрессия генов Vim, Actn-1, TNF $\alpha$ , C3 и IL-10 значительно усиливается в UUO почках, полученных как от мышей дикого типа, так и MASP-2 $^{-/-}$  мышей, без существенной разницы в уровнях экспрессии этих конкретных генов между мышами дикого типа и MASP-2 $^{-/-}$  мышами (данные не показаны). Уровни экспрессии генов Cdh-1 и IL-12a не изменились в окклюдированных почках животных ни в одной из групп (данные не показаны).

#### Обсуждение.

Признано, что UUO модель у грызунов вызывает раннее, активное и глубокое повреждение в окклюзированной почке с уменьшенным почечным кровотоком, интерстициальным воспалением и быстрым фиброзом в течение одной-двух недель после обструкции и широко используется для понимания общих механизмов и медиаторов воспаления и фиброза в почках (см., например, Chevalier R.L., *Kidney Int.*, 75:1145-1152, 2009; Yang H. et al., *Drug. Discov. Today Dis. Models.*, 7:13-19, 2010).

Результаты, описанные в этом примере, демонстрируют значимое снижение отложения коллагена и уровня инфильтрации макрофагов в UUO оперированных почках у MASP-2 $^{-/-}$  мышей по сравнению с контрольными (+/+) мышами дикого типа. Неожидаанные результаты, свидетельствующие о значимом сокращении повреждения почек как на гистологическом уровне, так и на уровне экспрессии генов у MASP-2 $^{-/-}$  животных, показывают, что лектиновый путь активации комплемента оказывает существенное влияние на развитие воспаления и фиброз в окклюзированной почке. Не ограничиваясь конкретной теорией, считается, что лектиновый путь оказывает существенное воздействие на патофизиологию фиброзного заболевания путем запуска и поддержания провоспалительных стимулов, которые закрепляют порочный круг, в котором повреждение клеток вызывает воспаление, что, в свою очередь, вызывает дальнейшее поражение клеток, рубцевание и потерю ткани. Исходя из этих результатов, ожидается, что подавление или блокада MASP-2 ингибитором будет иметь профилактический и/или терапевтический эффект, проявляемый в подавлении или профилактике фиброза почек, а также в подавлении или профилактике фиброза вообще (т.е. независимо от ткани или органа).

#### Пример 15.

В этом примере описан анализ эффективности моноклонального ингибирующего антитела MASP-2 в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO), мышинной модели фиброза почек.

#### Предпосылки/обоснование.

Облегчение тубулоинтерстициального фиброза, общей конечной точки многих почечных патологий, представляет собой важную мишень для методов лечения, направленных на профилактику прогрессирования почечных заболеваний. Учитывая нехватку новых и существующих методов лечения, направленных на воспалительные профиброзные пути при заболевании почек, существует острая потребность в разработке новых методов лечения. Многие пациенты с протеинурическим заболеванием почек имеют тубулоинтерстициальное воспаление и прогрессирующий фиброз, которые тесно связаны со снижением функции почек. Протеинурия сама по себе вызывает тубулоинтерстициальное воспаление и приводит к развитию протеинурической нефропатии (Brunskill N.J. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:504-505, 2004). Независимо от первичной болезни почек тубулоинтерстициальное воспаление и фиброз неизменно наблюдаются у пациентов с прогрессирующей почечной недостаточностью и тесно коррелируют со снижением экскреторной функции (Risdon RA et al., *Lancet*, 1:363-366, 1968; Schainuck L.I. et al., *Hum. Pathol.*, 1:631-640, 1970). Методы терапии, способные прервать общие ключевые клеточные пути, ведущие к фиброзу, найдут широкое применение при почечных расстройствах.

Как описано в примере 14, в UUO модели непротеинурического фиброза почек было установлено, что у MASP-2 $^{-/-}$  мышей наблюдается значительно более низкая степень фиброза и воспаления почек по сравнению с контрольными животными дикого типа, о чем свидетельствуют воспалительные клеточные инфильтраты (75%) и гистологические маркеры фиброза, такие как коллаген (уменьшение на одну треть), тем самым доказывая ключевую роль лектинового пути при фиброзе почек.

Как описано в примере 13, также было показано, что синтезированное моноклональное анти-MASP-2 антитело (OMS646-SGMI-2 слитый белок, содержащий пептид SGMI-2, слитый с С-концом тяжелой цепи OMS646), которое специфически блокирует функцию лектинового пути у человека, блокирует лектиновый путь у мышей. В этом примере OMS646-SGMI-2 анализировали в мышинной UUO модели фиброза почек у мышей дикого типа для определения способности специфического ингибитора MASP-2 подавлять фиброз почек.

#### Методы.

В этом исследовании оценивали влияние ингибирующего MASP-2 антитела (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) по сравнению с контрольным антителом к человеческому изотипу IgG4 (10 мг/кг ET904) и контролем в виде среды доставки у самцов WT мышей C57BL/6. Антитела (10 мг/кг) вводили группам из 9 мышей путем внутрибрюшинной (ip) инъекции на 7-, 4- и 1-й день до операции UUO и затем на 2-й день после операции. Образцы крови брали перед введением антител, и в конце эксперимента оценивали функциональную активность лектинового пути.

Операцию UUO, сбор тканей и окрашивание сириусом красным и специфическим к макрофагам антителом F4/80 проводили способами, описанными в примере 14.

Содержание гидроксипролина в почках мышей измеряли с помощью специфического тестового набора для колориметрического анализа (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя.

Для оценки фармакодинамического эффекта ингибирующего mAb-MASP-2 у мышей оценивали активность лектинового пути системы комплемента путем количественного определения индуцированной лектином активации C3 в минимально разбавленных образцах сыворотки, собранных в указанное время после i.p. введения мышам mAb MASP-2 или контрольного mAb. Вкратце полистирольные микросферы диаметром 7 мкм (Bangs Laboratories, Fisher IN, USA) покрывали маннаном путем инкубации в течение ночи с 30 мкг/мл маннана (Sigma) в натрий бикарбонатном буфере (pH 9,6), затем промывали, блокировали 1% фетальной бычьей сыворотки в PBS и ресуспендировали в PBS до конечной концентрации  $1 \times 10^8$  микросфер/мл. Реакции отложения комплемента инициировали добавлением 2,5 мкл микросфер, покрытых маннаном (~250000 микросфер), в 50 мкл минимально разведенных образцов мышинной сыворотки (конечная концентрация сыворотки 90%) с последующей инкубацией в течение 40 мин при 4°C. После прекращения реакции отложения путем добавления 250 мкл ледяного буфера для проточной цитометрии (FB:PBS, содержащий 0,1% фетальной бычьей сыворотки), микросферы собирали центрифугированием и промывали еще два раза 300 мкл ледяного FB.

Для количественной оценки индуцированной лектином активации C3 микросферы инкубировали в течение 1 ч при 4°C с 50 мкл кроличьего анти-человеческого C3c антитела (Dako, Carpinteria, CA, USA), разведенного в FB. После двух промывок FB для удаления несвязанного материала микросферы инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 50 мкл козлиного антикроличьего антитела, конъюгированного с PE-Cy5 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), разведенного в FB. После двух промывок FB для удаления несвязанного материала микросферы ресуспендировали в FB и анализировали с помощью цитометра FACS Calibur. Микросферы анализировали в виде однородной популяции, используя прямое и боковое рассеяние, и выполняли количественное определение отложения C3b в каждом образце в виде средней интенсивности флуоресценции.

Результаты.

Оценка отложения коллагена.

На фиг. 21 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным, где срезы тканей были получены через 7 дней после обструкции мочеточника у мышей дикого типа, получавших либо ингибирующее MASP-2 антитело, либо антитело изотипного контроля. Как показано на фиг. 21, срезы ткани из почек, собранных через 7 дней после обструкции (UUO), полученные от мышей дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, показали значимое снижение ( $p=0,0477$ ) отложения коллагена по сравнению с количеством отложений коллагена в срезах тканей из окклюдированных почек, полученных от мышей дикого типа, получавших IgG4 изотипный контроль.

Оценка содержания гидроксипролина.

Гидроксипролин измеряли в тканях почек в качестве индикатора содержания коллагена. Гидроксипролин является параметром, который является очень показательным индикатором патофизиологического прогрессирования заболевания, индуцированного в этой модели.

На фиг. 22 графически показано содержание гидроксипролина в почках, собранных через 7 дней после обструкции (UUO), полученных от мышей дикого типа, получавших либо ингибирующее MASP-2 антитело, либо антитело изотипного контроля. Как показано на фиг. 22, ткани окклюдированных почек мышей, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, показали значимое уменьшение гидроксипролина, индикатора содержания коллагена, по сравнению с почками мышей, получавших mAb изотипного контроля, IgG4 ( $p=0,0439$ ).

Оценка воспаления.

В окклюдированных почках от животных дикого типа, получавших антитело изотипного контроля, и животных дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, наблюдали обильный инфильтрат макрофагов. Тщательная количественная оценка не выявила существенной разницы в процентном содержании окрашенных макрофагов между этими двумя группами (данные не показаны). Однако несмотря на эквивалентное количество инфильтрирующих макрофагов в окклюдированных почках от животных, инъецированных ингибирующими MASP-2 антителами, фиброз развился в значительно меньшей степени, судя по окрашиванию сириусом красным, по сравнению с окклюдированными почками от животных, которым вводили изотипного контроля, этот результат согласуется с результатами, согласно которым ткани окклюдированных почек от мышей, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, имели значимо меньшее количество гидроксипролина, чем в почках мышей, получавших mAb изотипного контроля, IgG4.

Обсуждение.

Результаты, описанные в этом примере, показали, что использование ингибирующего MASP-2 антитела обеспечивает защиту от фиброза почек в UUO модели, что согласуется с результатами, описанными в примере 14, демонстрирующими что фиброз и воспаление почек у MASP-2-/- мыши в UUO мо-

дели проявились значимо меньшей степени по сравнению с мышами дикого типа. Результаты в этом примере демонстрируют уменьшенный фиброз у мышей, получавших ингибирующее MASP-2 антитело. Обнаружение того, что фиброз в UUO почках уменьшается у животных с уменьшением или блокадой MASP-2-зависимой активности лектинового пути, является очень значимым новым открытием. В совокупности результаты, представленные в примере 14 и в этом примере, демонстрируют благоприятный эффект ингибирования MASP-2 на тубулоинтерстициальное воспаление почек, повреждение канальцевых клеток, высвобождении профиброзных цитокинов и рубцевание. Уменьшение фиброза почек остается ключевой целью лечения почек. UUO модель является моделью тяжелого состояния с ускоренным фиброзом почек, и вмешательство, которое уменьшает фиброз в этой модели, например, использование ингибирующих MASP-2 антител, вероятно, будет использоваться для подавления или предотвращения фиброза почек. Результаты UUO модели, вероятно, также можно отнести к заболеваниям почек, характеризующимся гломерулярным и/или протеинурическим повреждениям канальцев.

#### Пример 16.

В этом примере представлены результаты, которые были получены с использованием модели фиброза, воспаления и тубулоинтерстициального повреждения почек на фоне вызванной передозировкой белка протеинурии у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей и мышей дикого типа для оценки роли лектинового пути при протеинурической нефропатии.

#### Предпосылки/обоснование.

Протеинурия является фактором риска развития фиброза почек и потери экскреторной функции независимо от первичной болезни почек (Tryggvason K. et al., *J. Intern. Med.*, 254:216-224, 2003; Williams M., *Am. J. Nephrol.*, 25:77-94, 2005). Понятие протеинурической нефропатии описывает токсические эффекты избыточного белка, поступающего в проксимальные канальцы в результате нарушения гломерулярной избирательной селективности (Brunskill N.J., *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 504-505, 2004; Baines R.J., *Nature Rev. Nephrol.*, 7:177-180, 2011). Это явление, обычное для многих заболеваний клубочков, приводит к провоспалительной среде рубцевания в почках и характеризуется изменениями в проксимальном росте канальцевых клеток, апоптозом, транскрипцией генов и продуцированием воспалительных цитокинов как следствие сигнальных путей с нарушенной регуляцией, стимулированных протеинурической канальцевой жидкостью. Протеинурическая нефропатия обычно признается ключевым фактором, способствующим прогрессирующему поражению почек, характерному для различных первичных патологий почек.

Хроническая болезнь почек поражает более 15% взрослого населения в Соединенных Штатах и ежегодно является причиной примерно 750000 смертей во всем мире (Lozano R. et al., *Lancet*, vol. 380, Issue, 9859:2095-2128, 2012). Протеинурия является показателем хронического заболевания почек, а также фактором, способствующим прогрессированию заболевания. Многие пациенты с протеинурическим заболеванием почек имеют тубулоинтерстициальное воспаление и прогрессирующий фиброз, которые тесно связаны со снижением функции почек. Протеинурия сама по себе вызывает тубулоинтерстициальное воспаление и приводит к развитию протеинурической нефропатии (Brunskill N.J. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:504-505, 2004). При протеинурических заболеваниях почек чрезмерное количество альбумина и других макромолекул фильтруется через клубочки и повторно поглощается проксимальными трубчатыми эпителиальными клетками. Это вызывает порочный воспалительный круг, опосредованный активацией комплемента, приводящей к инфильтратам цитокинов и лейкоцитов, которые вызывают интерстициальное повреждение канальцев и фиброз, тем самым усугубляя протеинурию и приводя к потере функции почек и, в конечном счете, к прогрессированию вплоть до терминальной стадии почечной недостаточности (см., например, Clark et al., *Canadian Medical Association Journal*, 178:173-175, 2008). Ожидается, что методы лечения, которые модулируют этот вредный цикл воспаления и протеинурии, улучшат исход при хроническом заболевании почек.

Учитывая положительный эффект ингибирования MASP-2 в UUO модели тубулоинтерстициального повреждения, был выполнен следующий эксперимент для определения, может ли ингибирование MASP-2 уменьшить повреждение почек в модели передозировки белка. В этом исследовании использовали передозировку белка для индуцирования протеинурического заболевания почек, как описано у Is-hola et al., *European Renal Association*, 21:591-597, 2006.

#### Методы.

Получали MASP-2<sup>-/-</sup> мышь, как описано в примере 1, и подвергали обратному скрещиванию в течение 10 поколений с BALB/c. В настоящем исследовании сравнивали результаты, полученные для мышей дикого типа и MASP-2<sup>-/-</sup> BALB/c мышей в модели индуцированной передозировкой белка протеинурии.

За неделю до начала эксперимента мышам удаляли одну почку перед передозировкой белка для получения оптимального ответа. Индуцирующий протеинурию агент представлял собой бычий сывороточный альбумин с низким уровнем эндотоксина (BSA, Sigma), который вводили в нормальном физиологическом растворе WT (n=7) и MASP-2<sup>-/-</sup> мышами (n=7) в следующих дозах: одну дозу по 2 мг BSA/г, 4 мг BSA/г, 6 мг BSA/г, 8 мг BSA/г, 10 мг BSA/г и 12 мг BSA/г массы тела и 9 доз по 15 мг BSA/г массы тела, в общей сложности в течение 15 дней было введено i.p. 15 доз. Контрольные мыши WT (n=4) и



MA SP-2-/- (n=4) мыши получали физиологический раствор, вводимый только внутривентрально. После введения последней дозы животных размещали по одному в метаболические клетки на 24 ч для сбора мочи. Кровь собирали с помощью сердечной пункции под наркозом, кровь оставляли для коагуляции на льду на 2 ч, и сыворотку отделяли центрифугированием. Образцы сыворотки и мочи собирали в конце эксперимента на 15-й день, хранили и замораживали для анализа.

Мышей умерщвляли через 24 ч после последнего введения BSA на 15-й день и для анализа собирали различные ткани. Почки собирали и обрабатывали для окрашивания H&E и иммуноокрашивания. Иммуногистохимическое окрашивание проводили следующим образом. Фиксированные в формалине, залитые парафином, 5-микронные срезы тканей почек от каждой мыши депарафинизировали и регидратировали. Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере при 95°C в течение 20 мин с последующей инкубацией тканей в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 мин. Затем ткани инкубировали в блокирующем буфере (10% сыворотки из вида, в котором было выращено вторичное антитело, и 1% BSA в PBS) с 10% раствором авидина в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы тканей промывали PBS после каждой стадии по три раза в течение 5 мин. Затем использовали первичное антитело в блокирующем буфере с 10% раствором биотина в течение 1 ч при концентрации 1:100 для антител F4/80 (Santa Cruz, кат. № sc-25830), TGFβ (Santa Cruz, кат. 1 sc-7892), IL-6 (Santa Cruz, кат. 1 sc-1265) и концентрации 1:50 для антитела TNFα (Santa Cruz, кат. 1 sc-1348). Затем применяли биотинилированное вторичное антитело в течение 30 мин при концентрации 1:200 для срезов с F4/80, TGFβ и IL-6 и 1:100 для срезов с TNFα с последующим применением конъюгата фермента HRP в течение еще 30 мин. Окрашивание проводили с помощью набора с субстратом диаминобензидина (DAB) (Vector Labs) в течение 10 мин и слайды промывали в воде, обезвоживали и готовили для исследования без контрастной окраски для упрощения компьютерного анализа. Окрашенные срезы тканей из почечного коркового вещества анализировали с помощью захвата цифрового изображения с последующей количественной оценкой с использованием программного обеспечения для автоматического анализа изображений.

Апоптоз оценивали в срезах тканей путем окрашивания концевой метки dUTP с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TUNEL) следующим образом. Апоптотические клетки в срезах почек окрашивали, используя набор с пероксидазой AporTag® Peroxidase (Millipore) следующим образом. Залитые парафином, фиксированные формалином срезы почек от каждой мыши депарафинизировали, регидратировали, а затем белок пермибилизировали с помощью протеиназы К (20 мкг/мл), которую наносили на каждый образец в течение 15 мин при комнатной температуре. Между стадиями образцы промывали PBS. Активность эндогенной пероксидазы гасили путем инкубации тканей в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 мин. Затем ткани инкубировали в уравнивающем буфере с последующей инкубацией с ферментом TdT в течение 1 ч при 37°C. После промывки в останавливающем/промывочном буфере в течение 10 мин конъюгат анти-дигоксигенина наносили на 30 мин при комнатной температуре с последующей промывкой. Окрашивание осуществляли с помощью набора с DAB-субстратом в течение 4 мин с последующей промывкой в воде. Ткани подвергали контрастному окрашиванию в гематоксилине и устанавливали в DBX. Частоту TUNEL окрашенных (коричневого цвета) апоптотических клеток подсчитывали вручную в последовательно выбранных 20 полях зрения коркового вещества под большим увеличением с помощью светового микроскопа Leica DBXM.

#### Результаты.

##### Оценка протеинурии.

Для подтверждения наличия протеинурии у мышей общий белок в сыворотке анализировали на 15-й день, а общее количество выделенного белка измеряли в образцах мочи, собранных в течение 24 ч, на 15-й день исследования.

На фиг. 23 графически показано общее количество сывороточных белков (мг/мл), измеренное на 15-й день у контрольных мышей дикого типа (n=2), получавших только физиологический раствор, мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и MAS P-2-/- мышей, получавших BSA (n=6). Как показано на фиг. 23, введение BSA увеличивало общий уровень белка в сыворотке как в группах дикого типа, так и в MAS P-2-/- группе более чем в два раза по сравнению с концентрацией в контрольной группе, получавшей только физиологический раствор, при этом между группами, получившими лечение, существенной разницы не наблюдалось.

На фиг. 24 графически показано общее количество белка (мг), выделенного с мочой, собранной в течение 24 ч на 15-й день изучения у контрольных мышей дикого типа (n=2), получавших только физиологический раствор, мышей дикого типа, получавших BSA (n=6) и MAS P-2-/- мышей, получавших BSA (n=6). Как показано на фиг. 24, на 15-й день этого исследования наблюдали примерно шестикратное увеличение общего количества выделенного с мочой белка в группах, получавших BSA, по сравнению с контрольной группой с имитированным лечением, которая получала только физиологический раствор. Результаты, приведенные на фиг. 23 и 24, свидетельствуют о том, что модель протеинурии работает, как ожидалось.

##### Оценка гистологических изменений в почках.

На фиг. 25 показаны репрезентативные окрашенные H&E срезы тканей почек, которые собирали на

15-й день исследования передозировки белка от мышей следующих групп:

- контрольные мыши дикого типа (панель A);
- MASP-2<sup>-/-</sup> контрольные мыши (панель B);
- мыши дикого типа, получавшие BSA (панель C); и
- (панель D) MASP-2<sup>-/-</sup> мыши, получавшие BSA (панель D).

Как показано на фиг. 25, в группе MASP-2<sup>-/-</sup> передозировки (панель D) наблюдали значительно более высокую степень сохранения ткани по сравнению с группой передозировки дикого типа (панель C) при одинаковом уровне провокации передозировкой белка. Например, капсулы Боумана у мышей дикого типа, получавших BSA (передозировка) (панель C), были значимо расширены по сравнению с капсулами Боумана в контрольной группе дикого типа (панель A). Напротив, у капсул Боумана мышей MASP-2<sup>-/-</sup> (передозировка), получавших такое же количество BSA (панель D), сохранялась морфология, аналогичная той, которая наблюдалась у контрольных MASP-2<sup>-/-</sup> мышей (панель B) и контрольных мышей дикого типа (панель A). Как дополнительно показано на фиг. 25, крупные литые структуры белков накапливаются в проксимальных и дистальных канальцах почечных участков у дикого типа (панель C), которые являются более крупными и более многочисленными по сравнению с таковыми у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей (панель D).

Следует также отметить, что анализ срезов почек в этом исследовании с помощью просвечивающего электронного микроскопа показал, что мыши, получавшие BSA, имели общее поражение на цилиарных краях в дистальных и проксимальных клетках почечного канальца с содержанием клеток и ядрами, внедрившимися в просвет канальца. Напротив, ткань у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей, получавших BSA, сохранялась.

Оценка инфильтрации макрофагов в почках.

Чтобы измерить степень воспаления, о чем свидетельствует инфильтрация макрофагов, срезы тканей собранных почек окрашивали также антителом к маркеру макрофагов F4/80 способами, описанными у Boor et al., J. of Am. Soc. Nephrology, 18:1508-1515, 2007.

На фиг. 26 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителом к маркеру макрофагов F4/80, показывающие среднюю окрашенную площадь макрофагов (%), где срезы тканей получали на 15-й день изучения передозировки белка у контрольных мышей дикого типа (n=2), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и MASP-2<sup>-/-</sup> мышей, получавших BSA (n=5). Как показано на фиг. 26, срезы тканей почек, окрашенные антителом к маркерам макрофагов F4/80, свидетельствуют о том, что, хотя обе группы, получавшие BSA, показали значимое увеличение инфильтрации макрофагов в почках (измеренное в виде % области окрашенных F4/80 антигенов) по сравнению с контрольными мышами дикого типа с имитированным лечением, значимое снижение инфильтрации макрофагов наблюдали в срезах тканей у получавших BSA MASP-2<sup>-/-</sup> мышей по сравнению с инфильтрацией макрофагов в срезах тканей у получавших BSA мышей дикого типа (значения  $p=0,0345$ ).

На фиг. 27A графически показан анализ наличия корреляции между уровнем макрофагов и протеинурией у каждой мыши дикого типа (n=6), получавшей BSA, в виде графика зависимости общего количества выделенного белка, измеренного в моче из 24-часового образца, от степени инфильтрации макрофагов (% средней окрашенной площади). Как показано на фиг. 27A, большинство образцов из почек дикого типа дала положительную корреляцию между уровнем протеинурии и степенью инфильтрации макрофагов.

На фиг. 27B графически показан анализ наличия корреляции между уровнем макрофагов и протеинурией у каждой MASP-2<sup>-/-</sup> мыши (n=5), получавшей BSA, в виде графика зависимости общего количества выделенного белка, измеренного в моче из 24-часового образца, от степени инфильтрации макрофагов (% средней окрашенной площади). Как показано на фиг. 27B, положительная корреляция, наблюдаемая у мышей дикого типа между уровнем протеинурии и степенью инфильтрации макрофагов (показана на фиг. 27A), не наблюдалась у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей. Не ограничиваясь конкретной теорией, эти результаты могут указывать на наличие механизма очистки от воспаления при высоких уровнях протеинурии у MASP-2<sup>-/-</sup> мышей.

Оценка инфильтрации цитокинов.

Интерлейкин 6 (IL-6), трансформирующий фактор роста бета (TGFβ) и фактор некроза опухоли альфа (TNFα) являются провоспалительными цитокинами, которые, как известно, активируются в проксимальных канальцах мышей дикого типа в модели протеинурии (Abbate M. et al., Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 17:2974-2984, 2006; David S. et al., Nephrology, Dialysis, Transplantation, Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 12:51-56, 1997). Срезы тканей почек окрашивали цитокин-специфическими антителами, как описано выше.

На фиг. 28 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-TGFβ антителом (измерено в виде % площади окрашенных анти-TGFβ антигенов) у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4) и MASP-2<sup>-/-</sup> мышей, получавших BSA (n=5). Как показано на фиг. 28, значимое увеличение окрашивания TGFβ наблюдалось в группе мышей дикого типа, получав-

шей BSA (передозировка), по сравнению с группой, MASP-2-/- мышей, получавшей BSA (передозировка) ( $p=0,026$ ).

На фиг. 29 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-TNF $\alpha$  антителом (измеренных в виде % площади окрашенных анти-TNF $\alpha$  антител), у мышей дикого типа, получавших BSA, и MASP-2-/- мышей, получавших BSA ( $n=5$ ). Как показано на фиг. 29, значимое увеличение окрашивания TNF $\alpha$  наблюдалось в группе дикого типа, получавшей BSA (передозировка), по сравнению с MASP-2-/- группой, получавшей BSA (передозировка) ( $p=0,0303$ ).

На фиг. 30 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-IL-6 антителом (измерено в виде % площади окрашенных анти-IL-6 антител) у контрольных мышей дикого типа, контрольных MASP-2-/- мышей, мышей дикого типа, получавших BSA ( $n=7$ ), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA ( $n=7$ ). Как показано на фиг. 30, в группе дикого типа, получавшей BSA, наблюдалось очень значительное увеличение окрашивания IL-6 по сравнению с MASP-2-/- группой, получавшей BSA ( $p=0,0016$ ).

Оценка апоптоза.

Апоптоз оценивали в тканевых срезах путем окрашивания концевой метки dUTP с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TUNEL), а частоту окрашенных TUNEL апоптотических клеток подсчитывали в последовательно выбранных 20 полях зрения коркового вещества под большим увеличением (HPF).

На фиг. 31 графически показана частота TUNEL-положительных апоптотических клеток, подсчитанных в последовательно выбранных 20 полях зрения под большим увеличением (HPF) в срезах тканей почечного коркового вещества у контрольных мышей дикого типа ( $n=1$ ), контрольных MASP-2-/- мышей ( $n=1$ ), мышей дикого типа, получавших BSA ( $n=6$ ), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA ( $n=7$ ). Как показано на фиг. 31, значительно более высокий уровень апоптоза в корковом веществе наблюдался в почках, полученных от мышей дикого типа, получавших BSA, по сравнению с почками, полученными от MASP-2-/- мышей, получавших BSA ( $p=0,0001$ ).

Общий обзор результатов и выводы.

Результаты этого примера свидетельствуют о том, что у MASP-2-/- мыши уменьшено повреждение почек в модели передозировки белка. Следовательно, ингибирующие MASP-2 агенты, такие как ингибирующие MASP-2 антитела, как ожидалось, подавляют или предотвращают вредный цикл воспаления и протеинурии и улучшают результаты при хроническом заболевании почек.

Пример 17.

В этом примере описан анализ моноклонального ингибирующего антитела MASP-2 на эффективность в снижении и/или предотвращении воспаления почек и тубулоинтерстициального повреждения в модели вызванной передозировкой белка протеинурии у мышей дикого типа.

Предпосылки/обоснование.

Как описано в примере 16, в модели вызванной передозировкой белка протеинурии было установлено, что MASP-2-/- мыши демонстрируют значительно лучшие результаты (например, меньшая степень тубулоинтерстициального повреждения и меньшая степень воспаления почек), чем мыши дикого типа, что подразумевает патогенную роль лектинового пути в протеинурическом заболевании почек.

Как описано в примере 13, было создано моноклональное ингибирующее MASP-2 антитело (OMS646-SGMI-2), которое специфически блокирует функцию лектинового пути у человека, а также было показано, что оно блокирует лектиновый путь у мышей. В этом примере оценивали эффективность ингибирующего MASP-2 антитела OMS646-SGMI-2 в мышинной модели вызванной передозировкой белка протеинурии в отношении уменьшения и/или профилактики воспаления почек и тубулоинтерстициального повреждения у мышей дикого типа.

Методы.

В этом исследовании оценивали влияние ингибирующего MASP-2 антитела (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) по сравнению с антителом к человеческому IgG4 изотипному контролю (10 мг/кг ET904) и контролем с физиологическим раствором.

Подобно исследованию, описанному в примере 16, в этом исследовании использовали передозировку белка для индуцирования протеинурического заболевания почек (Ishola et al., European Renal Association, 21:591-597, 2006). Протеинурию индуцировали у Balb/c мышей с одной удаленной почкой ежедневных i.p. инъекций эскалационных доз (от 2 до 15 г/кг) бычьего сывороточного альбумина с низким содержанием эндотоксина (BSA) в течение 15 дней, как описано в примере 16.

Лечение антителами осуществляли путем i.p. инъекции два раза в неделю, начиная за 7 дней до индукции протеинурии в течение всего исследования. Эта схема дозирования была выбрана на основе предыдущих исследований PK/PD и фармакологических исследований, демонстрирующих устойчивое подавление лектинового пути (данные не показаны). Мышей умерщвляли на 15-й день, почки собирали и обрабатывали для окрашивания H&E и иммуноокрашивания. Окрашенные срезы тканей из почечного коркового вещества анализировали с помощью захвата цифрового изображения с последующей количественной оценкой с использованием программного обеспечения для автоматического анализа изображений.

Оценку иммуногистохимического окрашивания и апоптоза проводили, как описано в примере 16. Результаты.

Оценка протеинурии.

Для подтверждения наличия протеинурии у мышей общее количество выделенного с мочой белка анализировали в образцах мочи, собранных в течение 24 ч, на 15-й день (конец эксперимента). Было установлено, что в образцах мочи общий уровень белка в среднем был увеличен почти в шесть раз в группах, получавших BSA, по сравнению с контрольными группами, не получавшими BSA (данные не показаны), что подтверждает наличие протеинурии у мышей, получавших BSA. В уровнях белка между группами, получавшими BSA, никаких существенных различий не наблюдалось.

Оценка гистологических изменений.

На фиг. 32 показаны типичные срезы окрашенных H&E тканей для следующих групп мышей на 15-й день после лечения BSA:

контрольные мыши дикого типа, получавших физиологический раствор (панель A);

контрольные мыши, получавшие изотип антитела (панель B); и

(панель C) мыши дикого типа, получавшие ингибирующее MASP-2 антитело (панель C).

Как показано на фиг. 32, в группе, получавшей ингибирующее MASP-2 антитело (панель C), наблюдалась значительно более высокая степень сохранения ткани по сравнению с группой дикого типа, получавшей физиологический раствор (панель A) или изотипный контроль (панель B), при том же уровне провокации передозировкой белка.

Оценка апоптоза.

Апоптоз оценивали в тканевых срезах путем окрашивания концевой метки dUTP с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TUNEL), а частоту окрашенных TUNEL апоптотических клеток подсчитывали в последовательно выбранных 20 полях зрения коркового вещества под большим увеличением (HPF). На фиг. 33 графически показана частота TUNEL-положительных апоптотических клеток, подсчитанная в последовательно выбранных 20 полях зрения под большим увеличением (HPF) в срезах тканей почечного коркового вещества у контрольных мышей дикого типа, получавших физиологический раствор и BSA (n=8), мышей дикого типа, получавших антитело изотипного контроля и BSA (n=8), и мышей дикого типа, получавших ингибирующее MASP-2 антитело и BSA (n=7). Как показано на фиг. 33, очень значительное снижение уровня апоптоза в корковом веществе наблюдалось в почках, полученных из группы, получавшей ингибирующее MASP-2 антитело, по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор и изотипный контроль ( $p=0,0002$  для контроля с физиологическим раствором против ингибирующего MASP-2 антитела;  $p=0,0052$  для изотипного контроля против ингибирующего MASP-2 антитела).

Оценка инфильтрации цитокинов.

В срезах тканей почек, полученных в этом исследовании, оценивали интерлейкин 6 (IL-6), трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ) и фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), которые являются провоспалительными цитокинами и, как известно, активируются в проксимальных канальцах у мышей дикого типа в модели протеинурии.

На фиг. 34 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-TGF $\beta$ -антителом (измеренных в виде % площади окрашенных анти-TGF $\beta$  антител) у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8). Как показано на фиг. 34, количественное определение окрашенных TGF $\beta$  областей показало значимое снижение уровней TGF $\beta$  у мышей, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, по сравнению с группами, получавшими физиологический раствор и антитела изотипного контроля (значения  $p=0,0324$  и  $0,0349$  соответственно).

На фиг. 35 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных TNF $\alpha$ -антителом (измеренных в виде % площади окрашенных анти-TNF $\alpha$  антител), у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8). Как показано на фиг. 35, анализ окрашенных срезов показал значимое снижение уровня TNF $\alpha$  в группе, получавшей ингибирующее MASP-2 антитело, по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор ( $p=0,011$ ), а также группой, получавшей изотипный контроль ( $p=0,0285$ ).

На фиг. 36 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных анти-IL-6 антителом (измеренных в виде % площади окрашенных анти-IL-6 антител) у мышей дикого типа, получавших BSA и физиологический раствор (n=8), мышей, получавших BSA и антитело изотипного контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и ингибирующее MASP-2 антитело (n=8). Как показано на фиг. 36, анализ окрашенных участков показал значимое снижение уровня IL-6 в группе, получавшей ингибирующее MASP-2 антитело, по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор ( $p=0,0269$ ), а также группой, получавшей изотипный контроль.

( $p=0,0455$ ).

Общий обзор результатов и выводы.

Результаты в этом примере демонстрируют, что использование ингибирующего MASP-2 антитела обеспечивает защиту от почечного повреждения в модели передозировки белка, что согласуется с результатами, описанными в примере 16, демонстрирующем, что у MASP-2-/- мышей уменьшено повреждение почек в модели протеинурии.

Пример 18.

В этом примере представлены результаты, которые были получены с использованием модели фиброза почек, воспаления и тубулоинтерстициального повреждения на фоне индуцированной адриамицином нефрологии у MASP-2-/- мышей и мышей дикого типа для оценки роли лектинового пути при протеинурической нефропатии.

Предпосылки/обоснование.

Адриамицин является антациклиновым противоопухолевым антибиотиком, используемым для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, включая гематологические злокачественные опухоли, саркомы мягких тканей и многие виды карцином. Адриамицин-индуцированная нефропатия - хорошо известная модель хронической болезни почек у грызунов, которая позволила лучше понять прогрессирование хронической протеинурии (Lee and Harris, *Nephrology*, 16:30-38, 2011). Тип структурного и функционального повреждения при индуцированной адриамицином нефропатии очень похож на тип хронического протеинурического заболевания почек у людей (Pippin et al., *American Journal of Renal Physiology*, 296:F213-29, 2009).

Адриамицин-индуцированная нефропатия характеризуется повреждением подоцитов с последующим гломерулосклерозом, тубулоинтерстициальным воспалением и фиброзом. Во многих исследованиях показано, что индуцированная адриамицином нефропатия модулируется как иммунными, так и неиммунными механизмами (Lee and Harris, *Nephrology*, 16:30-38, 2011). Адриамицин-индуцированная нефропатия имеет несколько преимуществ в качестве модели заболевания почек. Во-первых, это очень хорошо воспроизводимая и предсказуемая модель повреждения почек, поскольку она характеризуется индукцией повреждения почек в течение нескольких дней после введения лекарственного средства, что позволяет облегчить разработку эксперимента, так как повреждение развивается последовательно с течением времени. Это также модель, в которой степень повреждения ткани является серьезной, несмотря на приемлемый уровень смертности (<5%) и заболеваемости (потерей массы тела). Поэтому из-за тяжести и развитием со временем повреждения почек при индуцированной адриамицином нефропатии эта модель является подходящей для тестирования терапевтических методов, защищающих от повреждения почек.

Как описано в примерах 16 и 17, в модели индуцированной передозировкой белка протеинурии было установлено, что MASP-2-/- мыши и мыши, получавшие ингибирующее MASP-2 антитело, показали значительно улучшенные результаты (например, меньшая степень тубулоинтерстициального повреждения и меньшая степень воспаления почек), по сравнению с мышами дикого типа, что свидетельствует о патогенной роли лектинового пути при протеинурической болезни почек.

В этом примере MASP-2-/- мышей анализировали по сравнению с мышами дикого типа в индуцированной адриамицином (AN) нефрологической модели для определения того, может ли дефицит MASP-2 уменьшить и/или предотвратить развитие воспаления почек и тубулоинтерстициального повреждения, вызванного адриамицином.

Методы.

#### 1. Оптимизация дозы и временной точки.

Сначала проводили эксперимент для определения дозы адриамицина и временной точки, при которой у мышей BALB/c развивается уровень воспаления почек, подходящий для тестирования терапевтического вмешательства.

Трем группам мышей BALB/c дикого типа ( $n=8$ ) вводили IV одну дозу адриамицина (10,5 мг/кг). Мышей умерщвляли в трех точках: через одну неделю, две недели и четыре недели после введения адриамицина. Контрольным мышам вводили только физиологический раствор.

Результаты.

У всех мышей в трех группах наблюдали признаки гломерулосклероза и протеинурии, определяемые окрашиванием H&E, с постепенным увеличением степени воспаления тканей, как измерено по степени инфильтрации макрофагов в почках (данные не показаны). Степень повреждения ткани была умеренной в однонедельной группе, умеренной в двухнедельной группе и тяжелой в четырехнедельной группе (данные не показаны). Для оставшейся части исследования была выбрана двухнедельная точка.

#### 2. Анализ индуцированной адриамицином нефрологии у мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей.

Чтобы выяснить роль лектинового пути комплемента в индуцированной адриамицином нефрологии, группу MASP-2-/- (BALB/c) мышей сравнивали с мышами дикого типа (BALB/c) при одинаковой дозе адриамицина. MASP-2-/- мышей скрещивали с BALB/c мышами в течение 10 поколений.

Мышам дикого типа ( $n=8$ ) и MASP-2-/- мышам ( $n=8$ ) вводили IV адриамицин (10,5 мг/кг) и трем мышам каждой линии вводили только физиологический раствор в качестве контроля. Всех мышей

умерщвляли через две недели после лечения, и ткани собирали. Степень гистопатологического повреждения оценивали путем окрашивания H&E.

Результаты.

На фиг. 37 показаны типичные срезы окрашенных H&E тканей для следующих групп мышей на 14-й день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (контроль):

контрольные мыши дикого типа, получавшие только физиологический раствор (панели A-1, A-2, A-3);

мыши дикого типа, получавшие адриамицин (панели B-1, B-2, B-3); и

MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин (панели C-1, C-2, C-3).

Каждая фотография (например, панель A-1, A-2, A-3) представляет собой отдельную мышь.

Как показано на фиг. 37, в MASP-2-/- группе, получавшей адриамицин, наблюдается гораздо более высокая степень сохранения ткани по сравнению с группой дикого типа, получавшей такую же дозу адриамицина.

На фиг. 38 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных антителом к маркеру макрофагов F4/80, показывающие среднюю окрашенную площадь макрофагов (%) для следующих групп мышей на 14-й день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (контроль дикого типа):

контрольные мыши типа дикого, получавшие только физиологический раствор;

мыши дикого типа, получавшие адриамицин;

MASP-2-/- мыши, получавшие только физиологический раствор; и

MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин.

Как показано на фиг. 38, у MASP-2-/- мышей, получавших адриамицин, степень инфильтрации макрофагов снижена (\*\*p=0,007) по сравнению с мышами дикого типа, получавшими адриамицин.

На фиг. 39 графически показаны результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей почек, окрашенных сириусом красным, показывающие область окрашенного отложения коллагена (%) для следующих групп мышей на 14 день после лечения только адриамицином или физиологическим раствором (дикого типа контроль): контрольные мыши типа дикого, получавшие только физиологический раствор; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; MASP-2-/- мыши, получавшие только физиологический раствор, и MASP-2-/- мыши, получавшие адриамицин. Как показано на фиг. 39, у MASP-2-/- мышей, получавших адриамицин, степень отложения коллагена снижена (\*\*p=0,005) по сравнению с мышами дикого типа, получавшими адриамицин.

Результаты и выводы.

Облегчение почечного тубулоинтерстициального воспаления является ключевой целью лечения заболеваний почек.

Представленные в настоящем описании результаты показывают, что лектиновый путь активации комплемента вносит существенный вклад в развитие почечного тубулоинтерстициального воспаления. Как дополнительно показано в настоящем описании, ингибирующий MASP-2 агент, такой как ингибирующий MASP-2 антитело, может быть использован в качестве нового терапевтического подхода для лечения протеинурической нефропатии, адриамицин-индуцированной нефропатии и для уменьшения почечного тубулоинтерстициального воспаления.

Пример 19.

В этом примере описаны начальные результаты текущего клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у взрослых со стероидзависимой иммуноглобулин-А нефропатией (IgAN) и у взрослых со стероидзависимой мембранозной нефропатией (МН).

Предпосылки.

Хронические заболевания почек поражают более 20 млн человек в Соединенных Штатах (Drawz P. et al., Ann. Intern. Med., 162 (11), ITC1-16, 2015). Гломерулонефротии (GN), включая IgAN и МН, являются заболеваниями почек, при которых повреждены клубочки и которые часто приводят к терминальной стадии почечной недостаточности и диализу. Существует несколько типов первичных GN, наиболее распространенным из которых является IgAN. У многих из этих пациентов наблюдается персистирующее воспаление почек и прогрессирующее ухудшение состояния. Часто эти пациенты лечатся кортикостероидами или иммунодепрессантами, для которых характерны многочисленные серьезные отдаленные неблагоприятные последствия. У многих пациентов состояние продолжает ухудшаться даже при этих методах лечения. Способ лечения IgAN или МН отсутствует.

IgA-нефропатия.

Иммуноглобулин А нефропатия (IgAN) - это аутоиммунное заболевание почек, приводящее к внутреннему воспалению почек и их повреждению. IgAN является наиболее распространенным из первичных гломерулонефритов во всем мире (Magistroni et al., Kidney Int., 88(5):974-89, 2015). Судя по оценкам, при ежегодном уровне заболеваемости примерно 2,5 на 100000 человек у 1 из 1400 человек в США развивается IgAN. У 40% пациентов с IgAN болезнь будет прогрессировать до терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН) в пределах 20 лет после постановки диагноза (Corpo R., D'Amico G., J. Nephrol.,

18(5):503-12, 2005; Xie et al., PLoS One, 7(6):e38904 (2012)). У пациентов, как правило, наблюдается микроскопическая гематурия с легкой и умеренной протеинурией и различными уровнями почечной недостаточности (Wyatt R.J. et al., N. Engl. J. Med., 368(25):2402-14, 2013). Клинические маркеры, такие как нарушение функции почек, длительная гипертензия и тяжелая протеинурия (более 1 г в день), связаны с плохим прогнозом (Goto M et al., Transplant. Nephrol. Dial., 24(10):3068-74, 2009; Berthouix F. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 22(4):752-61, 2011). Протеинурия является самым сильным прогностическим фактором, не зависящим от других факторов риска по результатам нескольких крупных неэкспериментальных и проспективных исследований (Coppo R. et al., J. Nephrol., 18(5):503-12, 2005; Reich H.N. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 18(12):3177-83, 2007). По оценкам 15-20% пациентов достигают ТСПН в течение 10 лет после начала заболевания, если они не получают лечение (D'Amico G., Am. J. Kidney Dis., 36(2):227-37, 2000).

Диагностическим признаком IgAN является преобладание отложения либо только IgA, либо в комбинации с IgG, IgM или обоих в гломерулярном мезангиуме. При IgAN биопсия почек выявляет гломерулярное отложение маннанысвязывающего лектина (MBL), ключевой молекулы распознавания для активации MASP-2, эффекторного фермента лектинового пути системы комплемента. Гломерулярные отложения MBL, обычно локализованные совместно IgA и указывающие на активацию комплемента, и высокий уровень MBL в моче связаны с неблагоприятным прогнозом при IgAN, при этом у этих пациентов проявляются более серьезные гистологические изменения и мезангиальная пролиферация, чем у пациентов без отложения MBL или с высокими уровнями MBL в моче (Matsuda M. et al., Nephron, 80(4):408-13, 1998; Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol., 169(2):148-155, 2012; Roos A. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 17(6):1724-34, 2006; Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol., 174(1):152-60, 2013). Частота ремиссии также значительно ниже у пациентов с отложением MBL (Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol., 174(1):152-60, 2013).

Современные подходы к лечению IgAN основаны на попытках замедлить, остановить или отсрочить ухудшение функции почек. В руководстве по клинической практике при гломерулонефрите "Болезнь почек: улучшение общих результатов" (The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)) рекомендована схема лечения IgAN, согласно которой первостепенное внимание следует уделять контролю артериального давления путем блокады ренин-ангиотензиновой системы (RAS) [KDIGO Work Group, 2012]. Для пациентов с постоянной суточной протеинурией 1 г или более несмотря на максимально переносимые дозы антигипертензивных средств и хорошо контролируемое артериальное давление рекомендуемое лечение включает кортикостероиды и/или другие иммунодепрессанты, такие как циклофосфамид, азатиоприн или микофенолат мофетил. Согласно руководству по клинической практике при гломерулонефрите "Болезнь почек: улучшение общих результатов" (KDIGO) (Int. Soc. of Nephrol., 2(2):139-274, 2012) рекомендуется вводить кортикостероиды пациентам с протеинурией дозой выше или равной 1 г/день с обычной продолжительностью лечения 6 месяцев. Для пациентов с серповидной IgAN (определяемой как наличие серповидных клеток в >50% клубочков) и быстрым ухудшением функции почечного клиренса к кортикостероидам может быть добавлен другой иммунодепрессант (например, циклофосфамид). Однако даже при агрессивном иммуносупрессивном лечении, которое связано с серьезными отдаленными последствиями, у некоторых пациентов наблюдается прогрессирующее ухудшение функции почек. На сегодняшний день отсутствует одобренное FDA лечения IgAN даже в случае применения ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (ACE) или блокаторов рецепторов ангиотензина (ARB) для контроля артериального давления у некоторых пациентов сохраняется повышенная протеинурия. Было показано, что ни один из этих методов не останавливает или даже не замедляет прогрессирование IgAN у пациентов с риском быстрого прогрессирования заболевания. Альтернативные методы лечения, которые могли бы уменьшить или устранить необходимость в длительной кортикостероидной и/или иммуносупрессивной терапии, однозначно решили бы неудовлетворенные медицинские потребности.

Мембранозная нефропатия.

Ежегодный уровень заболеваемости мембранозной нефропатией (МН) составляет примерно 10-12 на 1000000 человек. Пациенты с МН могут иметь переменное течение заболевания, но примерно у 25% будет развиваться терминальная стадия почечной недостаточности.

Мембранозная нефропатия - это иммуномодулируемое клубочковое заболевание и одна из наиболее распространенных причин нефротического синдрома у взрослых. Болезнь характеризуется образованием иммунных отложений, в первую очередь IgG4, на наружном слое гломерулярной базальной мембраны, которые содержат антигены подоцитов и антитела, специфичные к этим антигенам, что приводит к активации комплемента. Первоначальные проявления МН связаны с нефротическим синдромом: протеинурией, гипоальбуминемией, гиперлипидемией и отеком.

Хотя МН может ослабевать спонтанно, без лечения, у одной трети пациентов наблюдается прогрессирующая потеря функции почек и прогрессирование заболевания до ТСПН в среднем через 5 лет после постановки диагноза. Часто для лечения МН применяются кортикостероиды, и существует необходимость в разработке альтернативных методов лечения. Кроме того, пациенты, которые, как считается, подвержены умеренному риску прогрессирования, в зависимости от тяжести протеинурии получают преднизон в сочетании с циклофосфамидом или ингибитором кальцинурина, и эти два метода лечения, применяемые совместно, часто связаны с серьезными системными побочными эффектами.

## Методы.

Два клинических исследования фазы 1, проведенные на здоровых добровольцах, продемонстрировали, что как внутривенное, так и подкожное введение ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646, приводило к устойчивому подавлению лектинового пути.

В этом примере описаны промежуточные результаты проводимой в настоящее время фазы 2 неконтролируемого, многоцентрового исследования ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646, у субъектов с IgAN и МН. Согласно критериям включения необходимо, чтобы состояние всех пациентов в этом исследовании, независимо от подтипа заболевания почек, поддерживалось приемом стабильной дозы кортикостероидов в течение по меньшей мере 12 недель до их включения в исследование (т.е. пациенты были зависимыми от стероидов). Исследование представляет собой несравнимое пилотное исследование с 12-недельным лечением и 6-недельным периодом наблюдения.

Согласно плану исследования необходимо набрать примерно по четыре пациента на одно заболевание. Исследование предназначено для оценки возможности OMS646 улучшать функцию почек (например, уменьшать тяжесть протеинурии) и снижать потребности в кортикостероидах у пациентов с IgAN и МН. На сегодняшний день 2 пациента с IgA нефропатией и 2 пациента с мембранозной нефропатией завершили лечение в этом исследовании.

Для вхождения в исследование каждый субъект должен иметь высокий уровень белка в моче, несмотря на постоянное лечение стабильной дозой кортикостероидов. Эти критерии выбраны для пациентов, у которых вряд ли произойдет спонтанное улучшение во время исследования.

Возраст субъектов во время отбора составлял  $\geq 18$ , и субъектов включали в исследование только в том случае, если у них диагностировали одно из следующего: IgAN при биопсии почек или первичную МН при биопсии почек. Зачисленные пациенты также должны были соответствовать всем приведенным ниже критериям включения

(1) среднее соотношение альбумин/креатинин в моче  $>0,6$  в трех образцах, собираемых последовательно и ежедневно перед каждым из двух посещений в период отбора;

(2) прием преднизона дозой  $\geq 10$  мг или эквивалентной дозы в течение по меньшей мере 12 недель до посещения 1 в период отбора;

(3) при фоновом иммуносупрессивном лечении (например, циклофосфамидом, микофенолат мофетиллом) прием стабильной дозы в течение как минимум 2 месяцев до визита 1 в период отбора без ожидаемого изменения дозы во время исследования;

(4) расчетная скорость клубочковой фильтрации (eGFR)  $\geq 30$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, вычисленная по уравнению MDRD<sup>1</sup>;

(5) прохождение назначенной врачом, стабильной, оптимизированной терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (ACEI) и/или блокаторами рецепторов ангиотензина (ARB), систолическое артериальное давление  $<150$  мм рт.ст., и диастолическое артериальное давление  $<90$  мм рт.ст. в расслабленном состоянии;

(6) не использование белимумаба, эцулизумаба или ритузумаба в течение 6 месяцев до посещения 1 в период отбора; а также

(7) отсутствие трансплантации почки.

<sup>1</sup> Уравнение MDRD:  $eGFR \text{ (мл/мин/1,73 м}^2\text{)} = 175 \times (SCr)^{-1,154} \times (\text{возраст})^{-0,203} \times (0,742, \text{ если женщина}) \times (1,122, \text{ если афроамериканец})$

Примечание: SCr=Измерение креатинина в сыворотке крови должно быть выражено в мг/дл.

Моноклональное антитело, используемое в этом исследовании, OMS646, представляет собой полностью человеческое IgG4 моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует человеческий MASP-2. MASP-2 является эффекторным ферментом лектинового пути. Как показано в примере 12, OMS646 эффективно связывается с рекомбинантным MASP-2 (кажущаяся равновесная константа диссоциации в диапазоне 100 пМ) и проявляет более чем 5000-кратную селективность к гомологичным белкам C1s, C1r и MASP-1. В функциональных анализах OMS646 подавляет активность лектинового пути человека с эффективностью в пределах наномолей (концентрация, обеспечивающая 50% ингибирование (IC<sub>50</sub>) составляет примерно 3 нМ), но не оказывает существенного влияния на классический путь. OMS646, вводимый либо внутривенной (IV), либо подкожной (SC) инъекцией мышам, нечеловеческим приматам и людям, приводила к высоким концентрациям в плазме, которые были связаны с подавлением активации лектинового пути в анализе ex vivo.

В этом исследовании лекарственное вещество OMS646 предоставлялось в концентрации 100 мг/мл, которое дополнительно разбавляли для IV введения. Соответствующий рассчитанный объем 100 мг/мл раствора OMS646 для инъекций извлекали из флакона с помощью шприца для приготовления дозы. Мешок для инфузии вводили в течение 4 ч после приготовления.

Исследование включало периоды скрининга (28 дней), лечения (12 недель) и последующего наблюдения (6 недель), как показано на схеме исследования, приведенной ниже.



Схема исследования.



Во время отбора до введения первой дозы OMS646 пациенты, прошедшие отбор, предоставляли по три образца мочи (которые собирали раз в сутки) в каждом из двух трехдневных периодов для установления исходных значений отношения альбумина к креатинину в моче. По истечении периода отбора отобранным субъектам вводили IV OMS646 по 4 мг/кг один раз в неделю в течение 12 недель (период лечения). После последней дозы OMS646 следовал 6-недельный период наблюдения.

В течение первых 4 недель лечения с помощью OMS646 испытуемые продолжали принимать стабильную дозу кортикостероидов, которую принимали до начала лечения. В конце первых 4-х недель 12-недельного периода прием субъектами кортикостероида постепенно сокращали (т.е. дозу кортикостероидов уменьшали), если это было возможно, в течение 4 недель, а затем следовали 4 недели, в течение которых продолжался прием полученной в результате уменьшенной дозы кортикостероидов. Целью было снижение дозы преднизона до <6 мг (или эквивалентной дозы) ежедневно. В этот период постепенное снижение дозы прекращали у пациентов, у которых наблюдалось ухудшение функции почек, по оценке исследователя. Субъектов лечили OMS646 на фоне постепенного снижения дозы кортикостероида и в течение полных 12 недель. Затем пациентов наблюдали в течение дополнительных 6 недель после последнего приема OMS646. Постепенное снижение дозы кортикостероидов и лечение OMS646 позволило оценить, позволяет ли прием OMS646 снижать дозы кортикостероидов, необходимых для поддержания стабильной функции почек.

Ключевыми мерами эффективности в этом исследовании являются изменение отношения альбумин/креатинин в моче (uACR) и 24-часовой уровень белка относительно исходного уровня, полученного до начала 12 недель. Измерение белка или альбумина в моче обычно используется для оценки поражения почек, а устойчивые высокие уровни белка в моче коррелируют с прогрессированием заболевания почек. uACR используется в клинических исследованиях для оценки протеинурии.

#### Оценка эффективности.

Анализируемое значение uACR определяют как среднее от всех значений, полученных в некоторой временной точке. Планируемое количество uACR равно трем для каждого запланированного момента времени. Исходное значение uACR определяли как среднее значение анализируемых значений при двух посещениях.

#### Результаты.

На фиг. 40 графически показаны uACR в двух пациентов с IgAN в течение двенадцати недельного исследования с еженедельным лечением ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646) в количестве 4 мг/кг. Как показано на фиг. 40, изменение от исходного уровня статистически значимо во временной точке "a" ( $p=0,003$ ), временной точке "b" ( $p=0,007$ ) и временной точке "c" ( $p=0,033$ ) согласно нетрансформированному анализу. В табл. 12 представлены данные для белка в 24-часовом сборе мочи пациентов с IgAN, получавших OMS646.

Таблица 12

Белок в 24-часовом сборе мочи (мг/сутки) у IgAN пациентов, получавших OMS646

| Время получения образца | Пациент 1<br>(мг/24 часа) | Пациент 2<br>(мг/24 часа) | Среднее значение |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| Исходный уровень        | 3876                      | 2437                      | 3156             |
| День 85                 | 1783                      | 455                       | 1119             |
| $P=0,017$               |                           |                           |                  |

Как показано на фиг. 40 и в табл. 12, в ходе исследования у пациентов с IgAN наблюдали клинически и статистически значимое улучшение функции почек. Статистически значимое снижение как величины uACR (см. фиг. 40), так и концентрации белка в 24-часовом сборе мочи (см. табл. 12). Как показывают данные uACR на фиг. 40, средний исходный уровень uACR составлял 1264 мг/г и к концу лечения достиг 525 мг/г ( $p=0,011$ ), снизившись до 128 мг/г к концу периода наблюдения. На фиг. 40 дополнительно показано, что лечебный эффект поддерживался на протяжении всего периода наблюдения. Измерения 24-часовой экскреции белка с мочой отслеживали по uACR, со средним снижением от 3156 мг/24 ч до 1119 мг/24 ч ( $p=0,017$ ). Эффекты лечения у двух пациентов были в высокой степени согласованными.

У обоих пациентов наблюдалось снижение примерно на 2000 мг/сут, и оба пациента достигали частичной ремиссии (определенной как более 50%-ное снижение экскреции белка в 24-часовом сборе мочи и/или конечной экскреции белка менее 1000 мг/сут; полную ремиссию определяли как экскреция белка менее 300 мг/сут). Величина 24-часового уменьшения протеинурии у обоих пациентов с IgA нефропатией связана со значительным улучшением выживаемости почек. Оба пациента с IgA нефропатией также оказались толерантными к существенному уменьшению принимаемых ими доз стероидов, со снижением суточной дозы до  $\leq 5$  мг (от 60 до 0 мг, от 30 до 5 мг).

У двух пациентов с МН также наблюдали снижение uACR во время лечения OMS646. У одного пациента с МН уровень uACR снизился с 1003 до 69 мг/г, и этот низкий уровень сохранялся в течение периода наблюдения. У другого пациента с МН наблюдалось снижение uACR с 1323 до 673 мг/г с изменяющимся курсом после лечения. У первого пациента с МН наблюдали выраженное снижение уровня белка в 24-часовом сборе мочи (10771 мг/24 ч в начале лечения до 325 мг/24 ч в день 85), что обеспечивало частичную и почти полную ремиссию, тогда как у другого оставалось практически неизменным (4272 мг/24 ч в начале лечения до 4502 мг/24 ч в день 85). Уровни стероидов у двух пациентов с МН постепенно снижались от 30 до 15 мг и от 10 до 5 мг.

Таким образом, согласованные улучшения функции почек наблюдали у пациентов с IgAN и МН, получавших лечение ингибирующим MASP-2 антителом, OMS646. Эффекты лечения OMS646 у пациентов с IgAN являются надежными и согласованными, что свидетельствует о сильном сигнале эффективности. Эти эффекты подтверждены результатами у пациентов с МН. Временной профиль и величина изменений uACR во время лечения были согласованными у всех четырех пациентов с IgAN и МН. Никаких существенных проблем с безопасностью не наблюдалось. Пациенты в этом исследовании относились к группе, труднодоступной для лечения, и терапевтический эффект у этих пациентов свидетельствует об эффективности ингибирующего MASP-2 антитела, такого как OMS646, у пациентов с IgAN и МН, таких как пациенты, страдающие стероидзависимым IgAN и МН (т.е. пациентов, получавших лечение стабильной дозой кортикостероидов до лечения ингибирующим MASP-2 антителом), в том числе пациентов с повышенным риском быстрого прогрессирования до терминальной стадии почечной недостаточности.

В соответствии с вышеизложенным в одном из вариантов осуществления изобретения предоставляется способ лечения человека, страдающего IgAN или МН, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном из вариантов осуществления способ включает введение человеку, страдающему IgAN или МН, количества ингибирующего MASP-2 антитела, достаточного для улучшения функции почек (например, уменьшения протеинурии). В одном из вариантов осуществления субъект страдает стероидзависимой IgAN. В одном из вариантов осуществления субъект страдает стероидзависимой МН. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводится субъекту, страдающему стероидзависимой IgAN или стероидзависимой МН, в количестве, достаточном для улучшения функции почек и/или снижения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта, страдающего стероидзависимой IgAN, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта, имеющего стероидзависимую МН, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых здесь вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело проявляет по меньшей мере одну или несколько из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с  $K_D$  10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело подавляет отложение C3b в анализе *in vitro* в 1% человеческой сыворотке с  $IC_{50}$  10 нМ или менее, указанное антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке с  $IC_{50}$  30 нМ или менее, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub> и F(ab')<sub>2</sub>, 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. В одном из вариантов осуществления антитело связывается с MASP-2 и избирательно подавляет лектиновый путь без подавления по существу классического пути (т.е. подавляет лектиновый путь, оставляя неповрежденным классический путь комплемента).

В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, связанных с функцией почек, таких как уменьшение протеинурии (например, уменьшение uACR и/или уменьшение концентрации белка в 24-часовом сборе мочи, такое как более чем 20% уменьшение экскреции белка в 24-часовом сборе мочи, или такое как более чем 30% уменьшение экскреции белка в 24-часовом сборе мочи, или такое как более чем 40% уменьшение экскреции белка в 24-часовом сборе мочи или, такое как

более 50% уменьшение экскреции белка в 24-часовом сборе мочи).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему IgAN (такой как стероидзависимая IgAN), через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере от одного дня до неделю или двух недель, или трех недель, или четырех недель или более) с последующим введением ингибирующего MASP-2 антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы в течение по меньшей мере двух недель или более).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 агента субъекту, страдающему МН (такой как стероидзависимая МН), через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель, или трех недель, или четырех недель, или более) с последующим введением ингибирующего MASP-2 антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы в течение по меньшей мере двух недель или более).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему IgAN (такой как стероидзависимая IgAN) или МН (такой как стероидзависимая МН) внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть хроническим и вводиться ежедневно ежемесячно, но предпочтительно по меньшей мере каждые две недели или по меньшей мере раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю.

В одном из вариантов осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего IgAN (такой как стероидзависимая IgAN) или МН (такой как стероидзависимая МН), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее

(I) а) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий

i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 31-35 в SEQ ID NO: 67; и

ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 50-65 в SEQ ID NO: 67; и

iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 95-107 в SEQ ID NO: 67; и

b) вариабельный участок легкой цепи, содержащий

i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 24-34 в SEQ ID NO: 69; и

ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 50-56 в SEQ ID NO: 69; и

iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из aa 89-97 в SEQ ID NO: 69; или

(II), его вариант, включающий вариабельный участок тяжелой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи с идентичностью по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, распознаваемом референсным антителом OMS646, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему или подверженному риску развития IgAN (такой как стероидзависимая IgAN) или МН (такой как стероидзависимая МН), композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокис-

лотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69, в дозе от 1 до 10 мг/кг (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) не реже одного раза 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, или в течение по меньшей мере 9 недель, или в течение по меньшей мере 10 недель, или в течение по меньшей мере 11 недель, или в течение по меньшей мере 12 недель.

Пример 20.

В этом примере описаны предварительные результаты фазы 2 продолжающегося в настоящее время клинического исследования по оценке безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у взрослых со стероидзависимым волчаночным нефритом (ВН).

Предпосылки.

Хроническими заболеваниями почек страдают более 20 млн человек в Соединенных Штатах (Drawz P. et al., *Ann. Intern. Med.*, 162 (11), ITC1-16, 2015). Гломерулонефropатии (GN), включая IgAN, МН и ВН, являются заболеваниями почек, при которых повреждаются клубочки, что часто приводит к терминальной стадии почечной недостаточности и диализу. У многих из этих пациентов имеется персистирующее воспаление почек и прогрессирующее ухудшение. Часто таких пациентов лечат кортикостероидами или иммунодепрессантами, для которых характерны многочисленные длительные серьезные неблагоприятные последствия. Даже при этих методах лечения у многих пациентов продолжается ухудшение.

Волчаночный нефрит.

Основным осложнением при системной красной волчанке (СКВ) является нефрит, также известный как волчаночный нефрит, который классифицируется как вторичная форма гломерулонефрита. Позже в ходе заболевания почти у 60% взрослых с СКВ развивается та или иная форма поражения почек (Koda-Kimble et al., *Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs*, 10th ed., Lippincott Williams & Wilkins, p. 792-9, 2012) с частотой 20-70 на 100000 человек в США. Волчаночный нефрит часто сопровождается у пациентов другими симптомами активной СКВ, включая усталость, лихорадку, сыпь, артрит, серозит или заболевание центральной нервной системы (Pisetsky D.S. et al., *Med. Clin. North. Am.*, 81(1):113-28, 1997). У некоторых пациентов наблюдается бессимптомный волчаночный нефрит; однако согласно результатам регулярного мониторинга, лабораторные отклонения, такие как повышенный уровень креатинина в сыворотке, низкий уровень альбумина или белок или осадок в моче, свидетельствуют об активном волчаночном нефрите. Аутоиммунитет играет важную роль в патогенезе волчаночного нефрита. Эти аутоантитела образуют внутрисосудистые патогенные иммунные комплексы, которые откладываются в клубочках. Аутоантитела могут также связываться с антигенами, уже расположенными в базальной мембране клубочков, образуя иммунные комплексы *in situ*. Иммунные комплексы способствуют воспалительному ответу, активируя комплемент и привлекая воспалительные клетки (D'Agati V.D. et al., *Lupus nephritis: pathology and pathogenesis*: Wallace D.J. Hahn, Dubois' *Lupus Erythematosus*, 7th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1094-111, 2007). Таким образом, активация комплемента, опосредованная иммунным комплексом, играет ключевую роль в патогенезе волчаночного нефрита. Отложения C4d присутствуют в почечной ткани и обычно связаны с отложениями иммунного комплекса, C1q и C3, иницируя классический путь. В некоторых случаях отложения C4d присутствуют без C1q, что указывает на возможное вовлечение лектинового пути (Kim M.K. et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 6 (10):2157-67, 2013).

Дополнительным подтверждением важной роли лектинового пути является тот факт, что отложения MBL происходят в очагах поражения кожи пациентов с СКВ (Wallim L.R. et al., *Hum. Immunol.*, 75(7):629-32, 2014). Кроме того, в большинстве биопсий почек у пациентов с волчаночным нефритом наблюдалось устойчивое отложение MBL и фиколинов (Nisihara R.M. et al., *Hum. Immunol.*, 74(8):907-10, 2013). Отложение MBL в почках наиболее явным было у пациентов с высокой протеинурией. Кроме того, уровни MBL в плазме были значительно выше у пациентов с СКВ, чем у здоровых контролей, а уровни MBL коррелировали с активностью заболевания, что позволяет предположить, что уровни MBL могут представлять собой биомаркер активности заболевания СКВ (Panda A.K. et al., *Arthritis. Res. Ther.*, 14(5):R218, 2012). Кортикостероиды являются основным традиционным вариантом лечения пациентов с волчаночным нефритом легкой степени. В более тяжелых случаях в клинической практике использовали высокие дозы преднизона, метилпреднизолон, микофенолат мофетила, циклофосфамида, азатиоприна и циклоспорина. Варианты лечения СКВ и волчаночного нефрита связаны с высокой частотой осложнений и смертностью. Побочные эффекты, особенно при длительном применении кортикостероидов, ограничивают соблюдение пациентом схемы лечения с последующим влиянием на его эффективность. Существует необходимость в разработке схем лечения, которые легче переносятся пациентами.

Методы.

Как описано выше в примере 19, два клинических исследования фазы 1, проведенных на здоровых добровольцах, продемонстрировали, что как внутривенное, так и подкожное введение ингибирующего

MASP-2 антитела, OMS646, приводило к устойчивому подавлению лектинового пути.

В этом примере описаны промежуточные результаты, полученные на фазе 2 продолжающегося в настоящее время неконтролируемого многоцентрового исследования ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646, у пациентов с волчаночным нефритом (ВН). В соответствии с критериями включения в исследование все пациенты в этом исследовании, независимо от подтипа заболевания почек, должны получать стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 12 недель до их включения в исследование (т.е. пациенты являются стероидозависимыми). Исследование представляет собой простое (без сравнения) пилотное исследование с 12-недельным курсом лечения и 6-недельным периодом наблюдения.

Исследование предназначено для оценки способности OMS646 улучшать функцию почек (например, ослабить протеинурию) и снижать потребность в кортикостероидах у пациентов с ВН. На сегодняшний день 5 пациентов с волчаночным нефритом (ВН) завершили лечение в исследовании.

В начале исследования каждый субъект должен иметь высокий уровень белка в моче несмотря на продолжающееся лечение стабильной дозой кортикостероидов. Эти критерии позволяют выбрать пациентов, у которых вряд ли будет наблюдаться спонтанное улучшение в течение периода исследования.

Во время скрининга возраст пациентов был  $\geq 18$  лет, и в исследование были включены только те пациенты, у которых при биопсии почек был диагностирован волчаночный нефрит. Включенные в исследование пациенты также должны были соответствовать всем следующим критериям включения

(1) среднее отношение альбумин/креатинин в моче  $>0,6$  в трех образцах, сдаваемых последовательно и ежедневно перед каждым из 2-х посещений в течение периода скрининга;

(2) прием  $\geq 10$  мг преднизона или эквивалентной дозы в течение не менее 12 недель до скрининга 1;

(3) в случае иммуносупрессивной терапии (например, циклофосфамидом, микофенолат мофетиллом), прием стабильной дозы в течение не менее 2 месяцев до скринингового визита 1 без ожидаемого изменения дозы на протяжении исследования;

(4) расчетная скорость клубочковой фильтрации (eGFR)  $\geq 30$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, вычисленная по уравнению MDRD<sup>1</sup>;

(5) получение под руководством врача стабильного оптимизированного лечения ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (ACEI) и/или блокаторами рецепторов ангиотензина (ARB), и систолическое артериальное давление  $<150$  мм рт.ст. и диастолическое артериальное давление  $<90$  мм рт.ст. в покое;

(6) не использование белимумаба, экулизумаба или ритузумаба в течение 6 месяцев после скринингового посещения 1; а также

(7) отсутствие в анамнезе трансплантации почки.

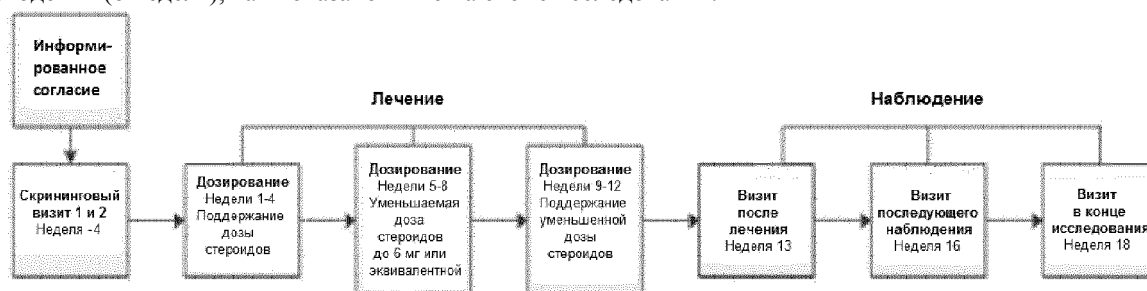
<sup>1</sup> Уравнение MDRD:  $eGFR \text{ (мл/мин/1,73м}^2\text{)} = 175 \times (SCr)^{-1.154} \times (Age)^{-0.203} \times (0,742 \text{ (для женщин)}) \times (1,212 \text{ (для афроамериканцев)})$

Примечание: SCr=уровень креатинина в сыворотке крови должен быть выражен в мг/дл.

Моноклональное антитело, используемое в этом исследовании, OMS646, является полностью человеческим моноклональным антителом IgG4, которое связывается и ингибирует MASP-2 человека. MASP-2 является эффекторным ферментом лектинового пути. Как показано в примере 12, OMS646 активно связывается с рекомбинантным MASP-2 (кажущаяся константа диссоциации равновесия составляет 100 пМ) и проявляет более чем 5000-кратную селективность по отношению к гомологичным белкам C1s, C1r и MASP-1. В функциональных анализах OMS646 подавляет лектиновый путь человека с наномолярной активностью (концентрация, приводящая к 50% ингибированию [IC<sub>50</sub>], составляет приблизительно 3 нМ), но не оказывает существенного влияния на классический путь. В ex vivo анализе высокие концентрации OMS646 в плазме, вводимого внутривенной (IV) или подкожной (SC) инъекцией мышам, приматам, отличным от человека, и людям, приводили к подавлению активации лектинового пути.

В этом исследовании лекарственное вещество OMS646 предоставляли в концентрации 100 мг/мл, которую затем разбавляли для внутривенного введения. Соответствующий рассчитанный объем инъекционного раствора OMS646 100 мг/мл извлекали из флакона шприцом для приготовления дозы. Инфузионный пакет вводили в течение 4 ч после приготовления.

Исследование состоит из периодов скрининга (28 дней), лечения (12 недель) и последующего наблюдения (6 недель), как показано ниже на схеме исследования.



Во время периода скрининга и перед введением первой дозы OMS646 испытуемые, соответствующие

шие критериям включения в исследование, сдавали по три образца мочи (собираемые раз в сутки) три дня подряд в каждый из двух периодов сдачи мочи в течение трех последовательных дней для определения исходного уровня белка в 24-часовом сборе мочи и отношения альбумин-креатинин в моче. После периода скрининга соответствующие критериям включения субъекты получали OMS646 в дозе 4 мг/кг внутривенно один раз в неделю в течение 12 недель (период лечения). После последней дозы OMS646 следовал 6-недельный период наблюдения.

В течение первых 4 недель лечения OMS646 субъекты получали стабильную дозу кортикостероидов, получаемую до исследования. В конце первых 4 недель 12-недельного периода лечения субъекты получали постепенно уменьшаемую дозу кортикостероидов (т.е. дозу кортикостероидов уменьшали), по возможности, в течение 4 недель, за которыми следовали 4 недели, в течение которых субъекты продолжали получать финальную дозу кортикостероидов. Целью было снижение суточной дозы преднизона до 6 мг (или эквивалентной дозы). В течение этого периода снижение дозы прекращали для тех субъектов, у которых, по оценкам исследователя, наблюдалось ухудшение почечной функции. Субъекты получали лечение OMS646 во время уменьшения дозы кортикостероидов и в течение всех 12 недель периода лечения. Затем пациентов наблюдали в течение дополнительных 6 недель после приема последней дозы. Снижение дозы кортикостероидов и лечение OMS646 позволило оценить способность OMS646 снижать дозу кортикостероидов, необходимую для поддержания стабильной функции почек.

Анализ эффективности.

Ключевым показателем эффективности в этом исследовании является изменение 24-часового уровня белка от исходного уровня в течение 12 недель. Измерение белка или альбумина в моче обычно используется для оценки поражения почек, а постоянный высокий уровень белка в моче коррелирует с прогрессированием заболевания почек. Частичная ремиссия определяется как более чем 50%-ное снижение 24-часовой экскреции белка с мочой.

Результаты.

В табл. 13 представлен уровень белка в 24-часовом сборе мочи (мг/сутки) для пяти пациентов с ВН, получавших OMS646.

Таблица 13  
Уровень белка в 24-часовом сборе мочи (мг/сутки) у пациентов с ВН, получавших OMS646

| Время<br>взятия<br>образца | Пациент<br>№1<br>(мг/<br>24 ч) | Пациент<br>№2<br>(мг/<br>24 ч) | Пациент №3<br>(мг/24 ч) | Пациент<br>№4<br>(мг/24 ч) | Пациент<br>№5<br>(мг/24 ч) | Среднее<br>значение<br>(пациенты<br>№2-5) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| Исходный<br>уровень        | 1112                           | 7539,0                         | 2066,9                  | 2217,8                     | 4067,0                     | 15890,7                                   |
| День 85                    | 13731                          | 2750,9                         | 282,0                   | 1168,0                     | 797,6                      | 4998,5                                    |

Примечание. У пациента № 1 во время лечения возникло внезапное обострение системного заболевания.

Как показано в табл. 13, у пациентов с ВН наблюдалось клинически и статистически значимое улучшение функции почек в течение всего исследования. Как показано в табл. 13, у четырех из пяти пациентов с ВН во время лечения наблюдали значимое (в среднем 69%) снижение 24-часовой экскреции белка с мочой. У пятого пациента (пациента № 1) произошло внезапное обострение системного заболевания с заметным увеличением. Для большинства респондентов с волчанкой дозы, принимаемых ими стероидов, были снижены.

Таким образом, значительное улучшение функции почек наблюдали у четырех из пяти пациентов с ВН, получавших ингибирующее MASP-2 антитело, OMS646. Результаты лечения OMS646 у пациентов с ВН были устойчивыми и достоверными, что свидетельствует о сильном сигнале эффективности. Никаких существенных проблем, связанных с безопасностью, не наблюдалось. В этом исследовании пациенты представляют трудную для лечения группу, и предполагается, что терапевтический эффект, наблюдаемый у этих пациентов является прогностическим фактором эффективности ингибирующего MASP-2 антитела, такого как OMS646, у пациентов с ВН, таких как пациенты, страдающие стероидзависимым ВН (т.е. пациенты, получавшие курс лечения стабильной дозой кортикостероидов до начала лечения ингибирующим MASP-2 антителом), включая пациентов с риском быстрого прогрессирования заболевания почек до терминальной стадии.

В соответствии с вышеизложенным, в одном из вариантов осуществления изобретения предлагается способ лечения субъекта-человека, страдающего от ВН, включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном из вариантов осуществления способ включает введение субъекту-человеку, страдающему от ВН, количества ингибирующего MASP-2 антитела, достаточ-

ного для улучшения функции почек (например, для ослабления протеинурии). В одном из вариантов осуществления субъект страдает от стероидзависимого ВН. В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту, страдающему стероидзависимым ВН, в количестве, достаточном для улучшения функции почек у указанного субъекта и/или уменьшения дозы кортикостероидов.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего стероидзависимым ВН, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящей заявке вариантов осуществления, ингибирующее MASP-2 антитело проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает MASP-2 человека с  $K_D$  10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* анализе 1% человеческой сыворотки при  $IC_{50}$  10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке при  $IC_{50}$  30 нМ или менее, причем антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub> и F(ab')<sub>2</sub>, причем антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, причем указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, причем указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, причем указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 содержит мутацию S228P. В одном из вариантов осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно подавляет лектиновый путь и по существу не подавляет классический путь (т.е. подавляет лектиновый путь, оставляя при этом классический путь комплемента без изменений).

В одном из вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту, страдающему ВН, в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, связанных с функцией почек, таких как ослабление протеинурии (например, уменьшение uACR и/или снижение концентрации белка в 24-часовом сборе мочи, например уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой более чем на 20% или уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой более чем на 30%, или уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой более чем на 40%, или, например, уменьшение 24-часовой экскреции белка с мочой более чем на 50%). В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту, страдающему от ВН, в количестве, эффективном для получения по меньшей мере частичной ремиссии протеинурии (т.е. более чем 50%-ного снижения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходным уровнем).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ВН (такого как стероидзависимый ВН), через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере одного дня в неделю, две недели, три недели или четыре недели или более) с последующим введением субъекту ингибирующего MASP-2 антитела подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы длительно по меньшей мере две недели или более).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ВН (такого как стероидзависимый ВН), внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть длительным и проводиться ежедневно или ежемесячно, но предпочтительно, по меньшей мере каждые две недели или по меньшей мере один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю.

В одном из вариантов осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от ВН (такого как стероидзависимый ВН), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее

- (I) (a) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий
  - i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 31-35 последовательности SEQ ID NO: 67; и
  - ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 50-65 последовательности SEQ ID NO: 67; и
  - iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 95-107 SEQ ID NO: 67; и
  - b) вариабельный участок легкой цепи, содержащий
    - i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 24-34 SEQ ID NO: 69;
    - ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 50-56 SEQ ID NO: 69; и
    - iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 89-97 SEQ ID NO: 69;

или

- (II) его вариант, включающий вариабельный участок тяжелой цепи с по меньшей мере 90% иден-

тичностью (например, с по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 67; и вариабельный участок легкой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью (например, с по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью) с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от ВН (такого как стероидзависимый ВН), композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от ВН (такого как стероидзависимый ВН), композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, распознаваемом референсным антителом OMS646, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему или подверженному риску развития ВН (такого как стероидзависимый ВН), композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, в дозе от 1 до 10 мг/кг (т.е. 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 периода по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель, или по меньшей мере 9 недель, или по меньшей мере 10 недель, или по меньшей мере 11 недель, или по меньшей мере 12 недель.

Пример 21.

В этом примере описаны дополнительные результаты, полученные в ходе продолжающейся в настоящее время фазы 2 клинических исследований, по оценке безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646, в отношении уменьшения протеинурии у взрослых пациентов с гломерулопатиями, включая IgAN, как описано в примере 19.

Методы.

Как описано в примере 19, в фазе 2 участвовали пациенты с IgAN, получавшие кортикостероиды во время их записи для участия в исследовании; все пациенты получали OMS646 открытым способом, и у двух пациентов с IgAN были получены положительные результаты. В настоящее время еще два пациента с IgAN завершили этап введения доз методами, описанными в примере 19, и в общей сложности уже четыре пациента с IgAN завершили исследование.

Для включения в это исследование пациенты с IgAN должны были иметь

- (1) диагностированную при биопсии IgAN;
- (2)  $uACR > 0,6$  г/г;
- (3)  $eGFR \geq 30$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>;
- (4) контролируемое артериальное давление во время лечения стабильной дозой ACEI/ARB; и
- (5) прием стабильной дозы стероида преднизона  $\geq 10$  мг в течение не менее 12 недель.

Все четыре взрослых пациента с IgAN, которых в этом исследовании лечили OMS646, имели ранее диагностированную почечную недостаточность с расчетной скоростью клубочковой фильтрации (eGFR) от 30 до 46 мл/мг/1,73 м<sup>2</sup> и 24-часовым уровнем белка от 2,44 до 4,87 г/24 ч. К началу исследования все пациенты получали стабильную блокаду ренин-ангиотензиновой системы (РАС) и по меньшей мере 3-месячное лечение кортикостероидами.

Все пациенты получали OMS646 IV один раз в неделю в течение 12 недель. Пациенты проходили четырехнедельный вводный период, после чего проводилось лечение OMS646, которое включало четыре недели приема стабильной дозы стероидов, четыре недели уменьшения принимаемой дозы стероидов, по возможности, и четыре недели приема уменьшенной дозы стероидов. После лечения OMS646 пациентов наблюдали в течение еще 6 недель, входящих в исследование. После завершения исследования, исследователь продолжал наблюдение пациентов.

Для оценки эффективности в исследовании измеряли следующие параметры:

- (1) соотношение альбумин/креатинин в моче (uACR), измеряемое 6 раз до лечения (исходный уровень) и 3 раза при каждой оценке эффективности во время лечения и наблюдения; и
- (2) уровень белка в 24-часовом сборе мочи, измеряемый один раз до лечения OMS646 и один раз



через 2-4 недели после завершения лечения OMS646.

Согласно протоколу, дозу кортикостероидов уменьшали между 4 и 8 неделями, если это было клинически целесообразно.

Результаты.

Четыре пациента с IgAN прошли 6-недельный период наблюдения после лечения. В табл. 14 представлены демографические и исходные характеристики этих пациентов.

Таблица 14

Демография и исходные характеристики

|                                     | Пациент 1 | Пациент 2 | Пациент 3 | Пациент 4 |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Возраст (годы)                      | 35        | 32        | 55        | 45        |
| Пол                                 | Мужской   | Женский   | Женский   | Женский   |
| Раса                                | Белый     | Азиат     | Белый     | Белый     |
| Время с момента постановки диагноза | 8 лет     | 5 месяцев | 5 месяцев | 2 года    |
| uACR (мг/г)                         | 1271      | 1256      | 1674      | 1628      |
| 24-х часовой уровень белка (мг)     | 3876      | 2437      | 4872      | 4554      |
| eGFR (мл/мин/SSA)                   | 46        | 30        | 44        | 42        |
| Артериальное давление (мм рт. ст.)  | 110/84    | 124/74    | 126/74    | 136/66    |

eGFR - расчетная скорость клубочковой фильтрации;

SSA стандартная площадь поверхности ( $1,73 \text{ м}^2$ );

uACR - отношение альбумин/креатинин в моче.

У всех пациентов наблюдали заметное уменьшение протеинурии во время лечения OMS646. Статистически и клинически значимые улучшения проявлялись как в величине uACR, так и в 24-часовых уровнях белка, как показано на фиг. 41 и 42.

На фиг. 41 показан график зависимости величины uACR (мг/г) от времени для четырех IgAN пациентов, получавших OMS646, от начального момента до дня 120. Как показано на фиг. 41, от начального момента до конца исследования среднее значение uACR уменьшилось на  $1,13 \text{ г/г} \pm 0,27$  (снижение на 77%,  $p=0,026$ ). Как дополнительно показано на фиг. 41, на момент последнего посещения в период наблюдения после лечения OMS646 величина uACR у каждого пациента снизилась на 94, 86, 47 и 89% (пациенты 1-4 соответственно) относительно исходного уровня.

На фиг. 42 графически показано изменение уровня белка в 24-часовом сборе мочи после лечения относительно исходного уровня в день 1 до лечения у четырех пациентов с IgAN, получавших OMS646. Как показано на фиг. 42, уровень белка в 24-часовом сборе мочи уменьшился на 54, 81, 63 и 95% (пациенты 1-4, соответственно) относительно исходного уровня.

На фиг. 43 графически показано среднее изменение уровня белка в 24-часовом сборе мочи после лечения относительно исходного уровня до лечения для четырех пациентов с IgAN, получавших OMS646. Как показано на фиг. 43, средний уровень белка в 24-часовом сборе мочи уменьшился на  $2,87 \pm 1,08 \text{ г/сутки}$  (снижение на 73%;  $p=0,013$ ).

Все пациенты были в состоянии прекратить прием кортикостероидов во время или вскоре после исследования, что является свидетельством того, что влияние OMS646 на протеинурию вряд ли связано с кортикостероидами. Расчетные скорости клубочковой фильтрации (eGFR) (рассчитанные по формуле модификации диеты при заболеваниях почек) были стабильными в течение всего периода лечения и последующего периода наблюдения.

OMS646 хорошо переносился всеми пациентами.

Таким образом, на фазе 2 этого открытого клинического исследования значительное и устойчивое снижение uACR наблюдалось у всех пациентов с IgAN, получавших OMS646 в течение 12 недель. 24-часовая протеинурия была значительно уменьшена у всех пациентов. Наблюдаемая степень уменьшения протеинурии была связана с существенными улучшениями прогнозов заболевания почек и клинических исходов (Inker L.A. et al., Am. J. Kidney. Dis., 68(3):392-401 (2016)). Результаты, демонстрирующие сильное уменьшение протеинурии, позволяющие отказаться от стероидов после лечения OMS646, моноклональным анти-MASP-2 антителом, которое подавляет действие лектинового пути комплемента, подтверждают возможность использования OMS646 в качестве терапевтического средства для улучшения

результатов лечения IgA гломерулопатии. Эффекты OMS646 у пациентов с IgAN являются стойкими и достоверными, свидетельствуя о его эффективности в этой популяции.

Пример 22.

Сохранение ремиссии после завершения лечения OMS646 у пациентов с IgA нефропатией (IgAN).

Предпосылки.

Согласно примерам 19 и 21, на фазе 2 исследований пациентов с IgAN четырех пациентов с IgAN лечили OMS646, полностью человеческим моноклональным антителом, которое ингибирует активность MASP-2. Как описано в примерах 19 и 21, все пациенты получали OMS646 IV один раз в неделю в течение 12 недель. Согласно примеру 21, после лечения OMS646 исследуемые пациенты находились под наблюдением еще 6 недель, и у всех пациентов с IgAN, принимавших OMS646, наблюдалась частичная ремиссия (определяемая как снижение более чем на 50% в 24-часовой экскреции белка с мочой и/или финальная экскреция белка менее 1000 мг/сут). Как описано в этом примере, после завершения исследования эти четыре пациента находились под наблюдением для оценки продолжительности ремиссии после лечения OMS646.

Методы.

После завершения фазы 2 клинических исследований, описанных в примере 21, исследователь наблюдал состояние 4-х пациентов с IgAN, получавших OMS646. Конечными точками в исследовании были uACR и 24-часовая протеинурия. Как описано в примере 21, в конце исследования у всех четырех пациентов с IgAN наблюдали частичную ремиссию. При последующем наблюдении измеряли отношение белка к креатинину в моче (uPCR). Каждое значение uPCR было преобразовано в uACR (отношение альбумин/креатинин в моче) путем умножения на 0,64 (см. Zhao et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 11:947-55, 2016).

Результаты.

У всех пациентов наблюдали частичную ремиссию после лечения OMS646. Средний возраст трех женщин и одного мужчины составлял 42 года; трое из них были европейцами, а один - азиатом. Среднее значение eGFR составило 41 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, а средняя вводимая доза стероидов составляла 55 мг. Период наблюдения после введения последней дозы OMS646 составлял от 2 до 10 месяцев. Как описано в примере 21, во время исследования среднее значение uACR уменьшилось на 77% (p=0,026). Во время наблюдения у трех пациентов сохранялась частичная ремиссия (снижение uACR на 54, 93 и 78% через 12, 12 и 5 месяцев соответственно). У одного пациента значение uACR составило 88% от исходного уровня через 7 месяцев. Во время наблюдения у трех пациентов также наблюдалось улучшение eGFR на 7, 13 и 7 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. eGFR у четвертого пациента было стабильным. Все пациенты прекратили прием стероидов. OMS646 хорошо переносился.

Таким образом, как описано в примере 21, протеинурия значительно уменьшилась у пациентов с IgAN в течение 12-недельного лечения OMS646 и 6-недельного периода наблюдения после лечения, входившего в исследование. Это уменьшение протеинурии сохранялось до 10 месяцев после завершения лечения. Эти данные подтверждают применение OMS646 в качестве терапевтического средства для улучшения результатов IgA гломерулопатии.

В обновленной информации, полученной от исследователя о состоянии четырех описанных в этом примере пациентов через примерно один год наблюдения после одного 12-недельного курса лечения OMS646, сообщалось о том, что у трех из четырех пациентов сохранялось уменьшение протеинурии. У этих трех пациентов uACR оставались сниженными на 14, 23 и 24% относительно исходных значений, которые были у пациентов до лечения OMS646. Кроме того, улучшение в расчетной скорости клубочковой фильтрации (eGFR), которая является мерой функции почек, после исследования наблюдалось у 3-х из 4-х пациентов. У пациента с наиболее выраженным снижением функции почек наблюдали улучшение eGFR с 30 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> до 47 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, т.е. улучшение составило 57%.

Таким образом, устойчивое уменьшение протеинурии после завершения одного курса лечения OMS646 оставалось впечатляющим в течение одного года наблюдения. Улучшение, наблюдаемое в значении eGFR, оказалось неожиданным, особенно через год наблюдения, поскольку предполагалось, что для этого потребуются более длительный период времени. Как описано выше, у двух из четырех пациентов наблюдали незначительное повышение eGFR, а ответ у одного из пациентов был впечатляющим - улучшение на 50%. Улучшения, наблюдаемые в eGFR, указывают на то, что дополнительное благоприятное воздействие, оказываемое OMS646 на пациентов, заключается в потенциальном исключении или существенной отсрочки необходимости диализа, а также в снижении риска осложнений, связанных с прогрессированием хронического заболевания почек.

В соответствии с вышеизложенным, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу уменьшения протеинурии у субъекта-человека, страдающего от IgAN, включающему введение субъекту ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариативный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариативный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69, в соответствии со следующими схемами дозирования:

с) введение примерно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 до 4,4 мг/кг) указанного антитела страдающему от IgAN субъекту внутривенно раз в неделю в течение периода лечения, составляющего по меньшей мере 12 недель; или

д) введение от примерно 180 мг до примерно 725 мг (т.е. от 162 до 797 мг) указанного антитела страдающему от IgAN субъекту внутривенно раз в неделю в течение периода лечения, составляющего по меньшей мере 12 недель,

при этом способ уменьшает протеинурию у указанного субъекта-человека.

В одном из вариантов осуществления доза ингибирующего MASP-2 антитела составляет примерно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 до 4,4 мг/кг), например примерно 3,6 мг/кг, примерно 3,7 мг/кг, примерно 3,8 мг/кг, примерно 3,9 мг/кг, примерно 4,0 мг/кг, примерно 4,1 мг/кг, примерно 4,2 мг/кг, примерно 4,3 мг/кг или примерно 4,4 мг/кг.

В одном из вариантов осуществления доза ингибирующего MASP-2 антитела представляет собой фиксированную дозу от примерно 180 мг до примерно 725 мг (т.е. от 160 до 800 мг или от примерно 300 до 500 мг, например от примерно 300 мг до примерно 400 мг), например примерно 160 мг, примерно 165 мг, примерно 170 мг, примерно 175 мг, примерно 180 мг, примерно 185 мг, примерно 190 мг, примерно 195 мг, примерно 200 мг, примерно 205 мг, примерно 210 мг, примерно 215 мг, примерно 220 мг, примерно 225 мг, примерно 230 мг, примерно 240 мг, примерно 245 мг, примерно 250 мг, примерно 255 мг, примерно 260 мг, примерно 265 мг, примерно 270 мг, примерно 275 мг, примерно 280 мг, примерно 285 мг, примерно 290 мг, примерно 295 мг, примерно 300 мг, примерно 305 мг, примерно 310 мг, примерно 315 мг, примерно 320 мг, примерно 325 мг, примерно 330 мг, примерно 335 мг, примерно 340 мг, примерно 345 мг, примерно 350 мг, примерно 355 мг, примерно 360 мг, примерно 365 мг, примерно 370 мг, примерно 375 мг, примерно 380 мг, примерно 385 мг, примерно 390 мг, примерно 395 мг, примерно 400 мг, примерно 405 мг, примерно 410 мг, примерно 415 мг, примерно 420 мг, примерно 425 мг, примерно 430 мг, примерно 435 мг, примерно 440 мг, примерно 445 мг, примерно 450 мг, примерно 455 мг, примерно 460 мг, примерно 465 мг, примерно 470 мг, примерно 475 мг, примерно 480 мг, примерно 485 мг, примерно 490 мг, примерно 495 мг, примерно 500 мг, примерно 505 мг, примерно 510 мг, примерно 515 мг, примерно 520 мг, примерно 525 мг, примерно 530 мг, примерно 535 мг, примерно 540 мг, примерно 545 мг, примерно 550 мг, примерно 555 мг, примерно 560 мг, примерно 565 мг, примерно 570 мг, примерно 575 мг, примерно 580 мг, примерно 585 мг, примерно 590 мг, примерно 595 мг, примерно 600 мг, примерно 605 мг, примерно 610 мг, примерно 615 мг, примерно 620 мг, примерно 625 мг, примерно 630 мг, примерно 635 мг, примерно 640 мг, примерно 645 мг, примерно 650 мг, примерно 655 мг, примерно 660 мг, примерно 665 мг, примерно 670 мг, примерно 675 мг, примерно 680 мг, примерно 685 мг, примерно 690 мг, примерно 695 мг, примерно 700 мг, примерно 705 мг, примерно 710 мг, примерно 715 мг, примерно 720 мг, примерно 725 мг, примерно 730 мг, примерно 735 мг, примерно 740 мг, примерно 745 мг, примерно 750 мг, примерно 755 мг, примерно 760 мг, примерно 765 мг, примерно 770 мг, примерно 775 мг, примерно 780 мг, примерно 785 мг, примерно 790 мг, примерно 795 мг, или примерно 800 мг.

В одном из вариантов осуществления период лечения составляет 12 недель.

В одном из вариантов осуществления за периодом лечения следует перерыв (т.е. период без введения ингибитора MASP-2), составляющий по меньшей мере 2 месяца, или перерыв, составляющий по меньшей мере 3 месяца, или перерыв, составляющий по меньшей мере 4 месяца, или перерыв, составляющий по меньшей мере 5 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 6 месяцев или больше, такой как перерыв, составляющий по меньшей мере 7 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 8 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 9 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 10 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 11 месяцев, или перерыв, составляющий по меньшей мере 12 месяцев или больше.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает периодический мониторинг уровней белка в моче у субъекта во время периода лечения и/или перерыва и, необязательно, возобновление лечения ингибирующим MASP-2 антителом после обнаружения рецидива протеинурии.

В некоторых вариантах осуществления способ эффективен для уменьшения протеинурии у субъекта, страдающего от IgAN, по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% или более чем на 50% от исходного уровня (до лечения), согласно результатам в конце периода лечения и/или в конце перерыва.

В некоторых вариантах осуществления способ эффективен для увеличения расчетной скорости клубочковой фильтрации (eGFR) у субъекта, страдающего от IgAN.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта, страдающего от IgAN, протеинурия составляет более 1 г белка/24-часовая экскреция белка с мочой до лечения, и способ эффективен для уменьшения протеинурии у субъекта по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере 40%, или по меньшей мере на 50%, или больше чем на 50% от исходного уровня (до лечения), согласно результатам в конце периода лечения и/или в конце перерыва, и/или для уменьшения протеинурии до уровня менее 1 г белка/24-часовая экскреция белка с мочой, согласно результатам в конце периода лечения и/или в конце перерыва.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от IgAN, имеет протеинурию, превышающую 1 г белка/24-часовая экскреция белка с мочой, несмотря на максимальные переносимые дозы антигипертензивных средств и хорошо контролируемое артериальное давление до лечения, и способ эффективен для уменьшения протеинурии у субъекта по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или более чем на 50% от исходного уровня (до лечения), определенного в конце периода лечения и/или в конце перерыва и/или для уменьшения протеинурии до менее чем 1 г белка/24-часовая экскреция белка с мочой, определенного в конце периода лечения и/или в конце перерыва.

В некоторых вариантах субъект, страдающий от IgAN, не лечился стероидами в течение по меньшей мере одного года. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от IgAN, получает лечение стероидами в течение по меньшей мере части 12-недельного периода лечения OMS646. В некоторых вариантах субъект, страдающий от IgAN, получает лечение стероидами в течение по меньшей мере части 12-недельного периода лечения OMS646, и способ эффективен для уменьшения протеинурии и уменьшения или устранения необходимости лечения стероидами к концу периода лечения и/или к концу перерыва.

Другие варианты осуществления.

Все публикации, патентные заявки и патенты, упомянутые в этом описании, включены в настоящее описание в виде ссылки.

Различные модификации и варианты описанных способов и композиций по изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности изобретения. Хотя изобретение описано в отношении конкретных предпочтительных вариантов осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение никоим образом не должно быть ограничено такими конкретными вариантами осуществления.

В соответствии с вышеизложенным изобретение предлагает следующие варианты осуществления.

1А. Способ лечения, подавления, облегчения или профилактики фиброза у млекопитающего, страдающего или имеющего риск развития заболевания или расстройства, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, включающий введение субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для подавления фиброза.

2А. Способ согласно параграфу 1А, где ингибирующий MASP-2 агент представляет собой MASP-2 антитело или его фрагмент.

3А. Способ согласно параграфу 2А, где ингибирующий MASP-2 агент представляет собой моноклональное MASP-2 антитело или его фрагмент, который специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6.

4А. Способ согласно параграфу 2А, где MASP-2 антитело или его фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, со сродством, в 10 раз превышающим сродство связывания с другим антигеном в системе комплемента.

5А. Способ согласно параграфу 2А, где антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

6А. Способ согласно параграфу 1А, где ингибирующий MASP-2 агент селективно подавляет активацию лектинового пути комплемента без существенного подавления C1q-зависимой активации комплемента.

7А. Способ согласно параграфу 1А, где ингибирующий MASP-2 агент вводят подкожно, интраперитонеально, внутримышечно, внутриартериально, внутривенно или путем ингаляции.

8А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, ассоциировано с ишемическим реперфузионным повреждением.

9А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, не является ассоциированным с ишемическим реперфузионным повреждением.

10А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где до введения ингибирующего MASP-2 агента субъект страдал от протеинурии и введение ингибирующего MASP-2 агента уменьшает протеинурию у субъекта.

11А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением почек.

12А. Способ согласно параграфу 11А, где ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для подавления тубулоинтерстициального фиброза.

13А. Способ согласно параграфу 11А, где ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффективном для уменьшения, задержки или устранения необходимости в диализе у субъекта.

14А. Способ согласно параграфу 11А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности, гломерулярного заболевания (например, фокального сегментарного гломерулосклероза), иммунного комплексного рас-

стройства (например, IgA-нефрпатии, мембранозной нефропатии), волчаночного нефрита, нефротического синдрома, диабетической нефропатии, тубулоинтерстициального поражения и гломерулонефрита (например, СЗ-гломерулопатии).

15А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением легких.

16А. Способ согласно параграфу 15А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, фиброза легких, ассоциированного со склеродермией, бронхоэктаза и легочной гипертензии.

17А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением печени.

18А. Способ согласно параграфу 17А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из цирроза, неалкогольной жировой болезни печени (стеатогепатита), фиброза печени, вторичного по отношению к злоупотреблению алкоголем, фиброза печени, вторичного по отношению к острому или хроническому гепатиту, билиарного заболевания и токсического поражения печени (например, лекарственно-индуцированной гепатотоксичности, вызванной ацетаминофеном или другим лекарственным средством, таким как нефротоксин).

19А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением сердца.

20А. Способ согласно параграфу 19А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из сердечного фиброза, инфаркта миокарда, фиброза клапана, фиброза предсердия, фиброза эндокарда, аритмической кардиомиопатии правого желудочка (АКПХ).

21А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным сосудистым фиброзом.

22А. Способ согласно параграфу 21А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из сосудистого заболевания, атеросклеротического сосудистого заболевания, стеноза сосудов, рестеноза, васкулита, флебита, тромбоза глубоких вен и аневризмы брюшной аорты.

23А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом кожи.

24А. Способ согласно параграфу 23А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из чрезмерного заживления ран, склеродермии, системного склероза, келоидов, заболеваний соединительной ткани, рубцевания и гипертрофических рубцов.

25А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом суставов.

26А. Способ согласно параграфу 25А, где заболевание или расстройство представляет собой артрофиброз.

27А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом центральной нервной системы.

28. Способ согласно параграфу 27А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из инсульта, травматического повреждения головного мозга и повреждения спинного мозга.

29А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом пищеварительной системы.

30А. Способ согласно параграфу 29А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из болезни Крона, фиброза поджелудочной железы и язвенного колита.

31А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным глазным фиброзом.

32А. Способ согласно параграфу 31А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из передней субкапсулярной катаракты, помутнения задней капсулы, дегенерации желтого пятна и ретиальной и витреальной ретинопатии.

33А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом кости или структуры мягких тканей костно-мышечной системы.

34А. Способ согласно параграфу 33А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из остеопороза и/или остеопении, связанной с кистозным фиброзом, миелодиспластических состояний с увеличением костного фиброза, клеточного капсулита, контрактуры Дюпюитрена и миелофиброза.

35А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает заболеванием или расстройством, вызванным или осложненным фиброзом репродуктивных органов.

36А. Способ согласно параграфу 35А, где заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из эндометриоза и болезни Пейрони.

37А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает хроническим инфекционным заболеванием, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением.

38А. Способ согласно параграфу 37А, где инфекционное заболевание выбирают из группы, состоя-

щей из альфа-вируса, гепатита А, гепатита В, гепатита С, туберкулеза, ВИЧ и гриппа.

39А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает аутоиммунным заболеванием, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением.

40А. Способ согласно параграфу 39А, где аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из склеродермии и системной красной волчанки (СКВ).

41А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, где субъект страдает от рубцевания, связанного с травмой.

42А. Способ согласно параграфу 41А, где рубцевание, связанное с травмой, выбирают из группы, состоящей из хирургических осложнений (например, хирургических спаек, в которых рубцовая ткань может образовываться между внутренними органами, вызывая контрактуру, боль, и может приводить к бесплодию), индуцированного химиотерапевтическими средствами фиброза, индуцированного радиацией фиброза и рубцевания, связанного с ожогами.

43А. Способ согласно любому из параграфов 1А-7А, в котором заболевание или расстройство, вызванное или осложненное фиброзом и/или воспалением, выбирают из группы, состоящей из трансплантации органов, фиброза молочной железы, мышечного фиброза, ретроперитонеального фиброза, фиброза щитовидной железы, фиброза лимфатических узлов, фиброза мочевого пузыря и плеврального фиброза.

1В. Способ профилактики или уменьшения поражения почек у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с протеинурией, включающий введение количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для уменьшения или профилактики протеинурии у субъекта.

2В. Способ согласно параграфу 1В, где ингибирующий MASP-2 агент представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело или его фрагмент.

3В. Способ согласно параграфу 1В или 2В, где ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта перед лечением.

4В. Способ согласно любому из параграфов 1В-3В, где заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией, выбирают из группы, состоящей из нефротического синдрома, преэклампсии, эклампсии, токсического поражения почек, амилоидоза, сосудисто-коллагенозных заболеваний (например, системной красной волчанки), волчаночного нефрита, обезвоживания, гломерулярных заболеваний (например, мембранозного гломерулонефрита, фокального сегментарного гломерулонефрита, С3-гломерулопатии, болезни минимальных изменений, липоидного нефроза), интенсивной физической нагрузки, стресса, доброкачественной ортостатической (постуральной) протеинурии, фокального сегментарного гломерулосклероза, IgA-нефропатии (например, болезни Бергера), IgM-нефропатии, мембранопролиферативного гломерулонефрита, мембранозной нефропатии, болезни минимальных изменений, саркоидоза, синдрома Альпорта, сахарного диабета (диабетической нефропатии), лекарственно-индуцированной токсичности (например, индуцированной НПВП, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами), ингибиторами АПФ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином) или другими нефротоксинами); болезни Фабри, инфекций (например, ВИЧ, сифилиса, гепатита А, В или С, постстрептококковой инфекции, мочевого шистосомоза); аминокацидурий, синдрома Фанкони, гипертонического нефросклероза, интерстициального нефрита, серповидноклеточной болезни, гемоглобинурии, множественной миеломы, миоглобинурии, отторжения органов (например, отторжения трансплантата почки), геморрагической лихорадки эбола, синдрома ногтевой пателлы, семейной лихорадки, синдрома HELLP, системной красной волчанки, гранулематоза Вегенера, ревматоидного артрита, болезни накопления гликогена типа 1, синдрома Гудпасчера, пурпуры Шенляйна-Геноха, инфекции мочевых путей, распространившейся на почки, синдрома Шегрена и пост-инфекционного гломерулонефрита.

5В. Способ согласно любому из параграфов 1В-3В, где заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией, представляет собой IgA-нефропатию (т.е. болезнь Бергера).

6В. Способ согласно любому из параграфов 1В-3В, где заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией, представляет собой мембранозную нефропатию.

7В. Способ согласно любому из параграфов 1В-3В, где заболевание или состояние, ассоциированное с протеинурией, представляет собой волчаночный нефрит.

1С. Способ подавления прогрессирования хронического заболевания почек, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для уменьшения или профилактики тубулоинтерстициального фиброза почек.

2С. Способ согласно параграфу 1С, где ингибирующий MASP-2 агент представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело или его фрагмент.

3С. Способ согласно параграфу 1С, где нуждающийся в этом субъект имеет протеинурию до введения ингибирующего MASP-2 агента и введение ингибирующего MASP-2 агента уменьшает протеинурию у субъекта, так что у субъекта имеется по меньшей мере 20%-ное снижение 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у указанного субъекта до начала лечения.

4С. Способ согласно параграфу 1С, где ингибирующий MASP-2 агент вводят в количестве, эффек-

тивном для уменьшения, задержки или устранения необходимости в диализе у субъекта.

1D. Способ защиты почек от поражения почек у субъекта, который получал, получает или будет получать лечение одним или более нефротоксическими агентами, включающий введение количества ингибирующего MASP-2 агента, эффективного для профилактики или облегчения лекарственно-индуцированной нефропатии.

2D. Способ согласно параграфу 1D, где ингибирующий MASP-2 агент представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело или его фрагмент.

3D. Способ согласно параграфу 1C, где ингибирующий MASP-2 агент вводят перед введением указанного нефротоксического агента.

4D. Способ согласно параграфу 1C, в котором ингибирующий MASP-2 агент вводят вместе с указанным нефротоксическим агентом.

5D. Способ согласно параграфу 1C, где ингибирующий MASP-2 агент вводят после указанного нефротоксического агента для лечения нефротоксичности.

1E. Способ лечения человека, страдающего иммуноглобин А нефропатией (IgAN), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

2E. Способ согласно параграфу 1E, где субъект страдает стероидзависимой IgAN.

3E. Способ согласно параграфу 1E или 2E, где ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с человеческим MASP-2.

4E. Способ согласно любому из параграфов 1E-3E, где антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека.

5E. Способ согласно любому из параграфов 1E-4E, где ингибирующее MASP-2 антитело по существу не подавляет классический путь.

6E. Способ согласно любому из параграфов 1E-5E, где ингибирующее MASP-2 антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке с IC<sub>50</sub> 30 нМ или менее.

7E. Способ согласно параграфу 2E, дополнительно включающий идентификацию человека, имеющего стероидзависимую IgAN, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для улучшения функции почек.

8E. Способ согласно любому из параграфов 1E-7E, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек.

9E. Способ согласно параграфу 8E, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения.

10E. Способ согласно параграфу 1E, где композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

11E. Способ согласно любому из параграфов 1E-10E, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

1F. Способ лечения человека, страдающего мембранозной нефропатией (MN), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

2F. Способ согласно параграфу 1F, где субъект страдает стероидзависимой MN.

3F. Способ согласно параграфу 1F или 2F, где ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с MASP-2 человека.

4F. Способ согласно любому из параграфов 1F-3F, где антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека.

5F. Способ согласно любому из параграфов 1F-4F, где ингибирующее MASP-2 антитело по существу не подавляет классический путь.

6F. Способ согласно любому из параграфов 1F-5F, где ингибирующее MASP-2 антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке с IC<sub>50</sub> 30 нМ или менее.

7F. Способ согласно параграфу 1F, где способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, имеющего стероидзависимую MN, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для улучшения функции почек.

8F. Способ согласно любому из параграфов 1F-7F, где ингибирующее MASP-2 антитело или его ан-

тигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек.

9F. Способ согласно параграфу 8F, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения.

10F. Способ согласно параграфу 1F или 2F, где композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

11F. Способ согласно любому из параграфов 1F-10F, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

1G. Способ лечения субъекта-человека, страдающего от волчаночного нефрита (ВН), включающий введение субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента.

2G. Способ согласно параграфу 1G, где субъект страдает от стероидзависимого ВН.

3G. Способ согласно параграфу 1G или 2G, где ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфически связывается с MASP-2 человека.

4G. Способ согласно любому из параграфов 1G-3G, где антитело или его фрагмент выбрано из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека.

5G. Способ согласно любому из параграфов 1G-4G, где ингибирующее MASP-2 антитело по существу не подавляет классический путь.

6G. Способ согласно любому из параграфов 1G-5G, где ингибирующее MASP-2 антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке с  $IC_{50}$  30 нМ или менее.

7G. Способ согласно параграфу 1G, где способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, имеющего стероидзависимый ВН, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для улучшения функции почек.

8G. Способ согласно любому из параграфов 1G-7G, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для улучшения функции почек.

9G. Способ согласно параграфу 8G, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения.

10G. Способ согласно параграфу 1G или 2G, где композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

11G. Способ согласно любому из параграфов 1G-10G, где ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69.

Хотя продемонстрированы и описаны иллюстративные варианты осуществления, будет понятно, что могут быть внесены различные изменения без отклонения от сущности и объема изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, страдающего от стероидзависимого волчаночного нефрита (ВН), включающий введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с MASP-2 человека и подавляет MASP-2-зависимую активацию комплемента в количестве, эффективном для улучшения функции почек, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 69.

2. Способ по п.1, в котором антитело или его фрагмент выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела с пониженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека.

3. Способ по п.1, в котором ингибирующее MASP-2 антитело подавляет отложение C3b в 90%-ной человеческой сыворотке с  $IC_{50}$  30 нМ или менее.

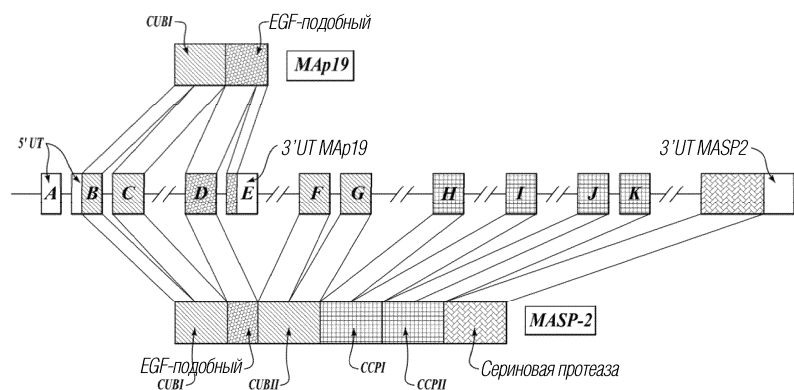
4. Способ по п.1, в котором способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, имеющего стероидзависимый ВН, до этапа введения субъекту композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективное для улучшения



функции почек.

5. Способ по п.1, в котором ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве и в течение периода времени, которые являются эффективными для достижения по меньшей мере 20%-ного уменьшения 24-часовой экскреции белка с мочой по сравнению с исходной 24-часовой экскрецией белка с мочой у субъекта до лечения.

6. Способ по п.1, в котором композицию вводят в количестве, достаточном для улучшения функции почек и уменьшения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

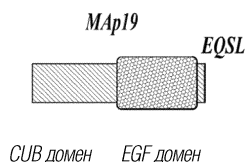


ФИГ. 1

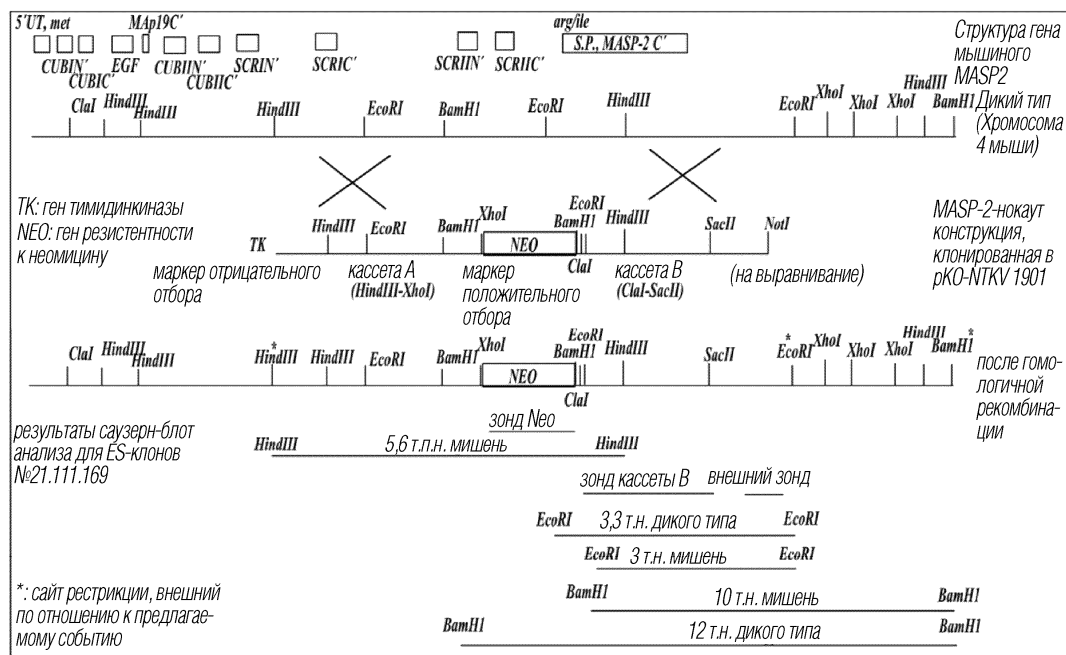
*Clr/Cls/MASP-1/MASP-2/MASP-3*



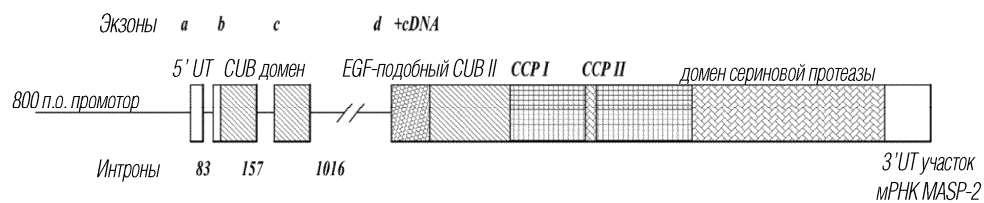
ФИГ. 2А



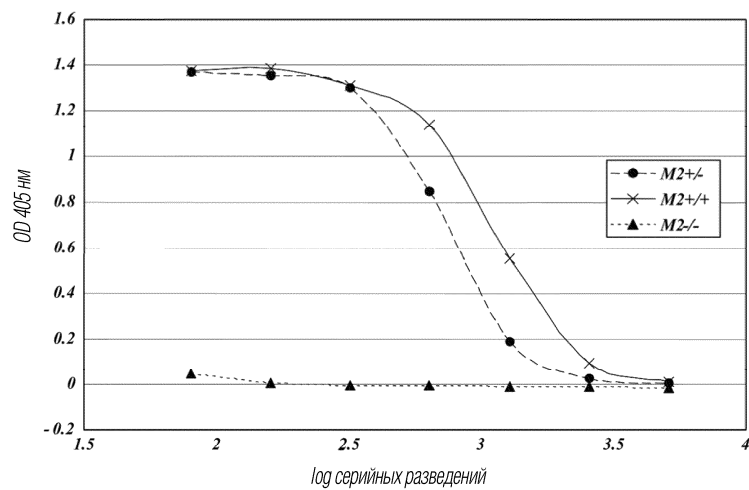
ФИГ. 2В



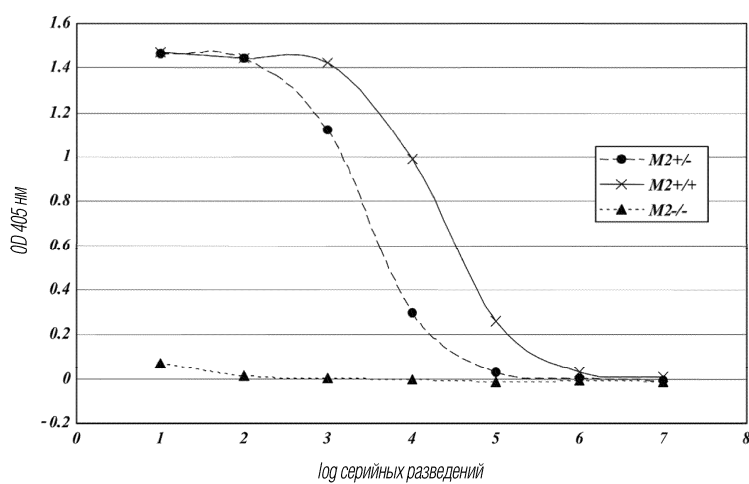
ФИГ. 3



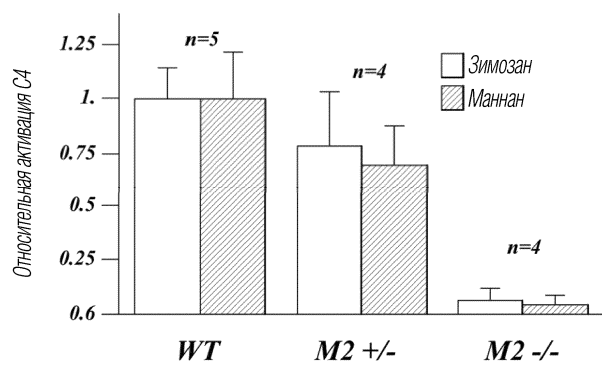
Фиг. 4



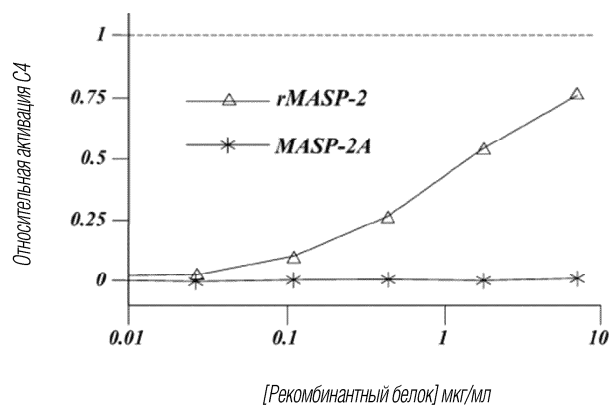
Фиг. 5А



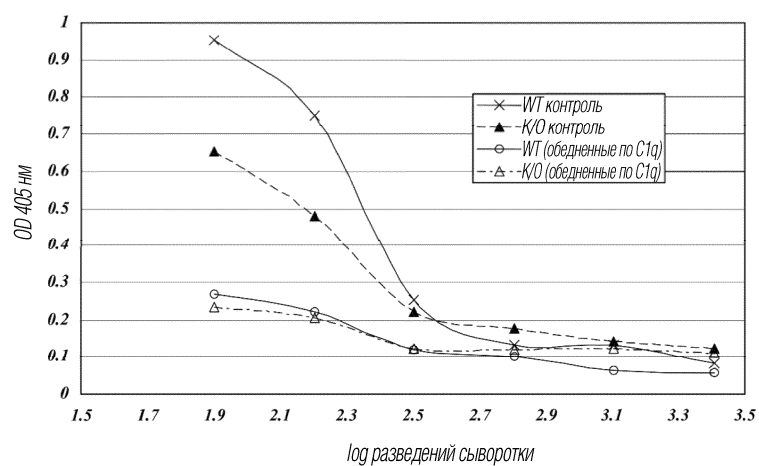
Фиг. 5В



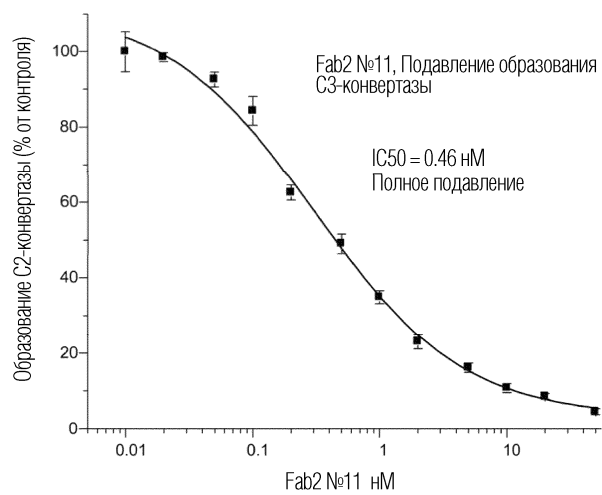
Фиг. 5С



Фиг. 6

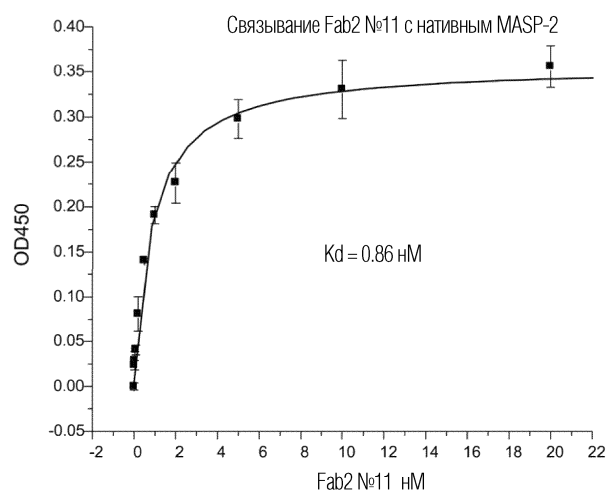


Фиг. 7

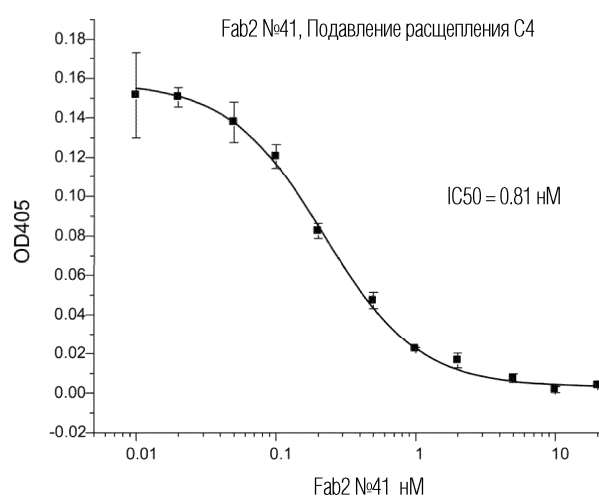


Фиг. 8A

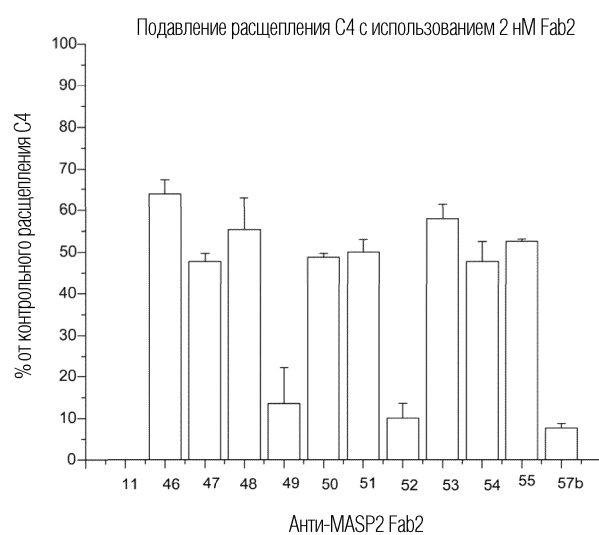
043102



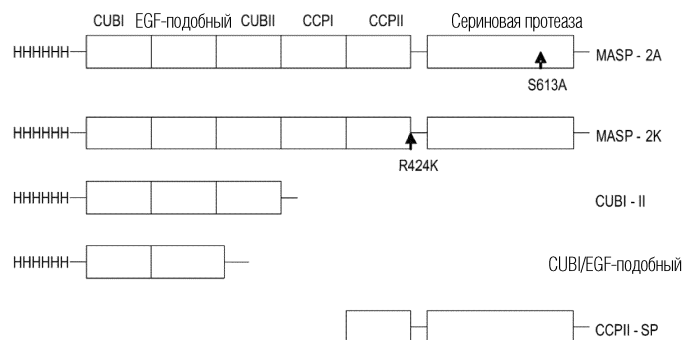
Фиг. 8В



Фиг. 8С

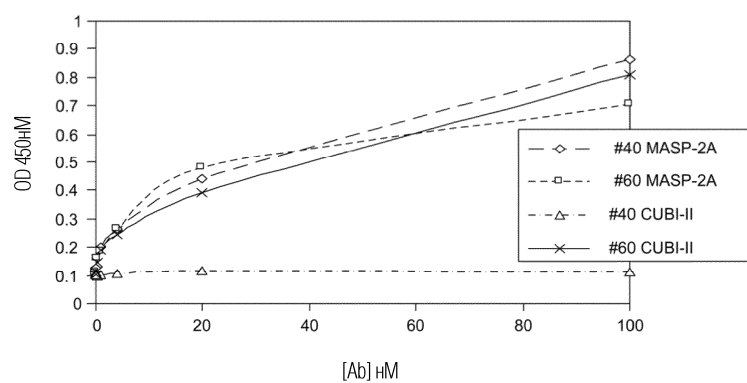


Фиг. 9

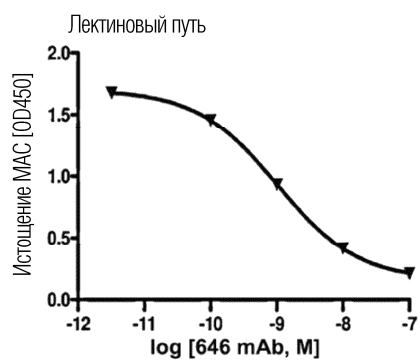


Фиг. 10

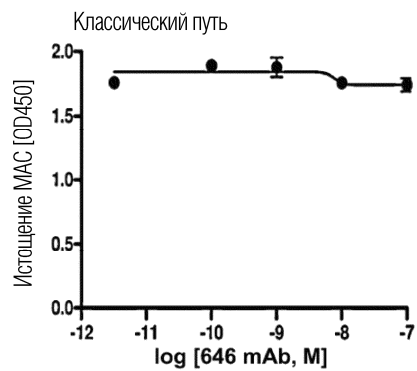
Связывание AbD Ab №40 & №60 с полипептидами  
крысиного MASP2



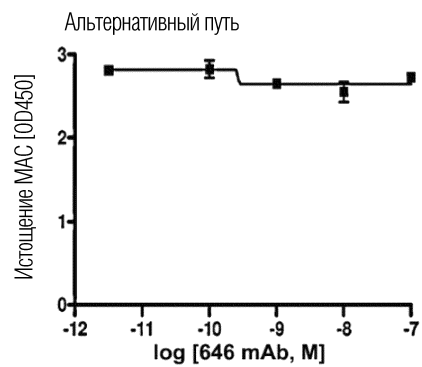
Фиг. 11



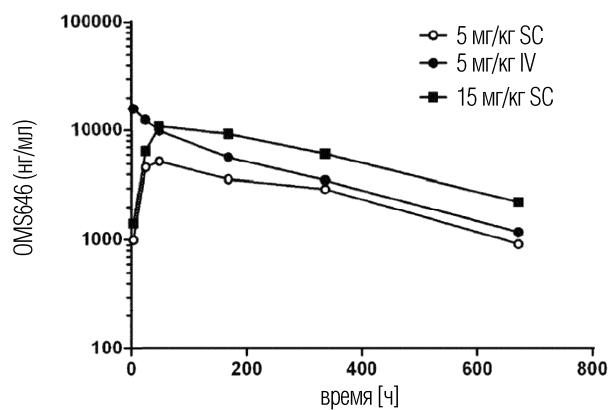
Фиг. 12А



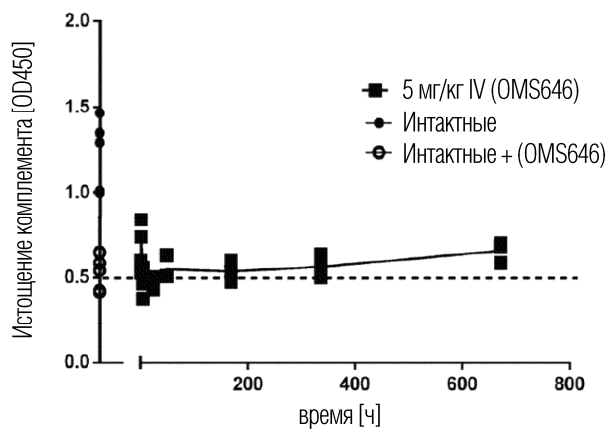
Фиг. 12В



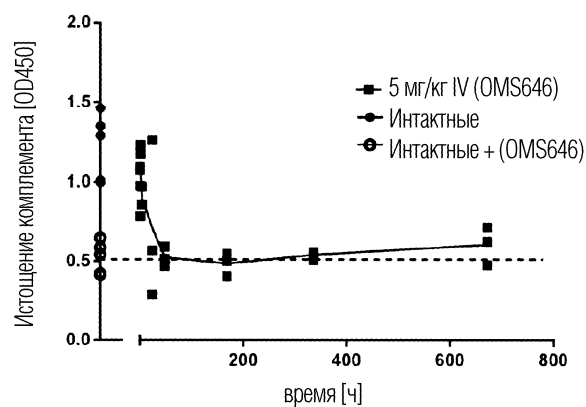
Фиг. 12С



Фиг. 13

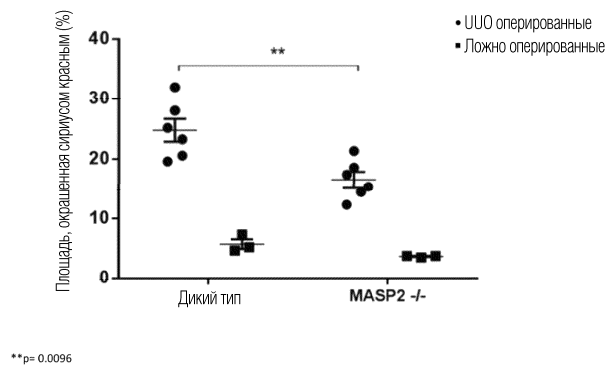


Фиг. 14А

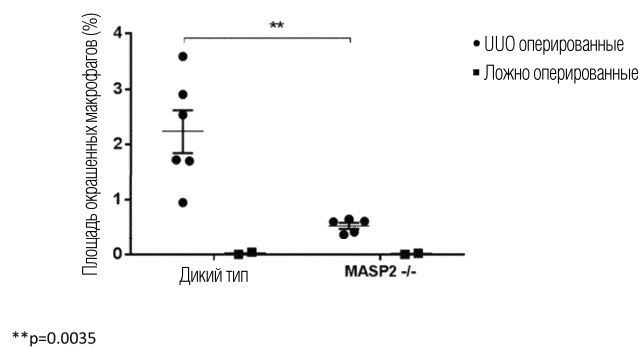


Фиг. 14В

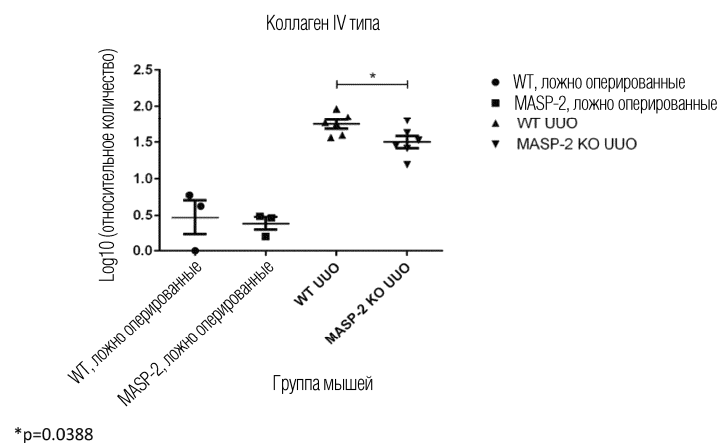
043102



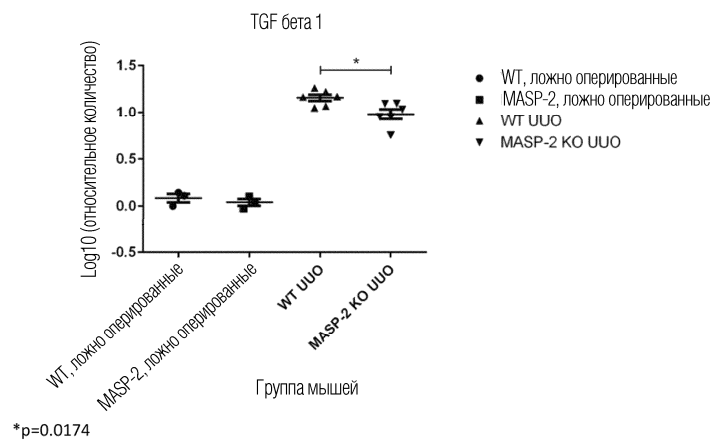
Фиг. 15



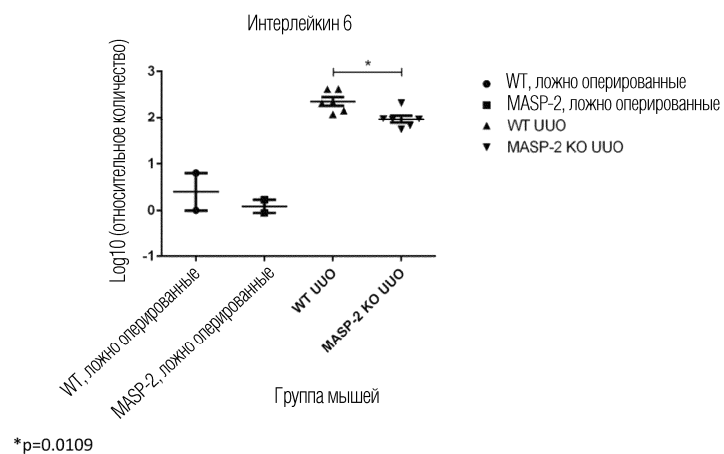
Фиг. 16



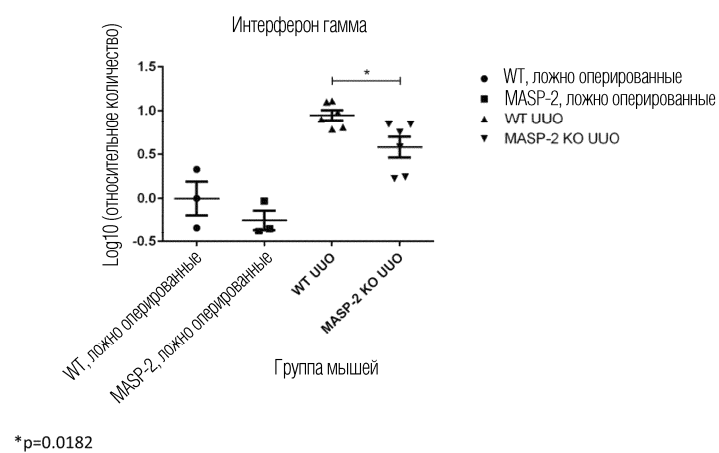
Фиг. 17



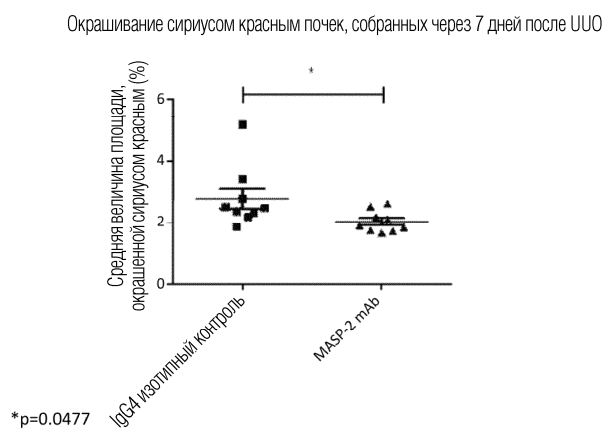
Фиг. 18



Фиг. 19



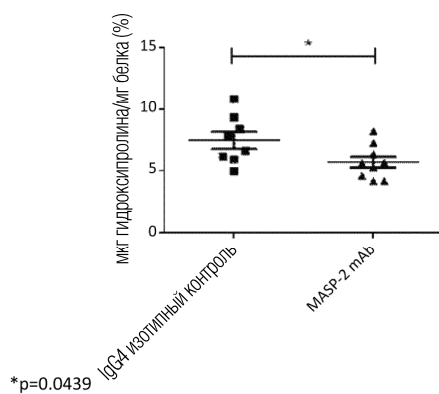
Фиг. 20



Фиг. 21

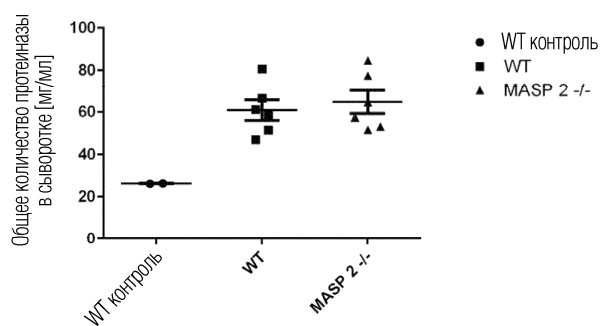


Содержание гидроксипролина в почках, собранных через 7 дней после UUO



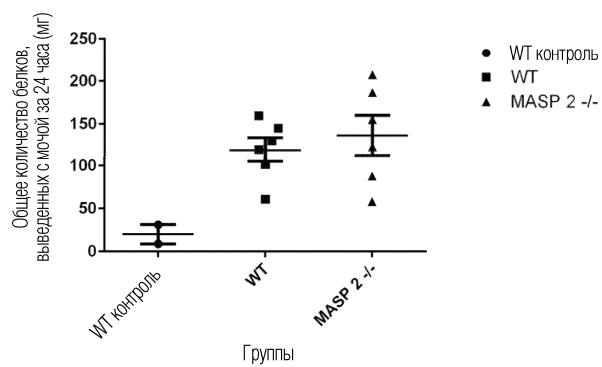
Фиг. 22

Общее количество протеиназы в сыворотке

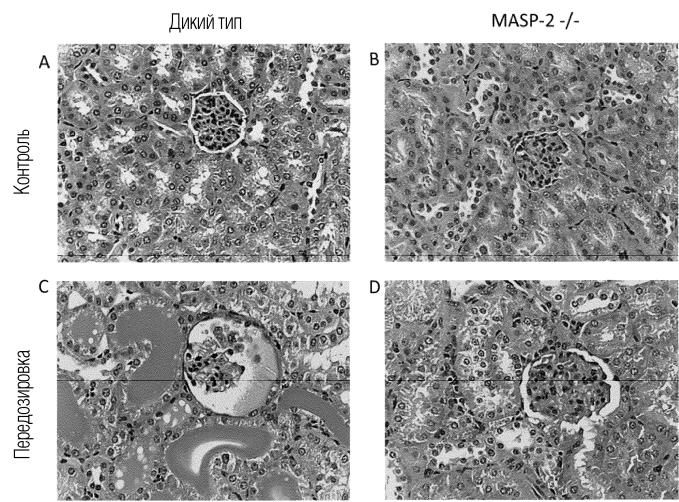


Фиг. 23

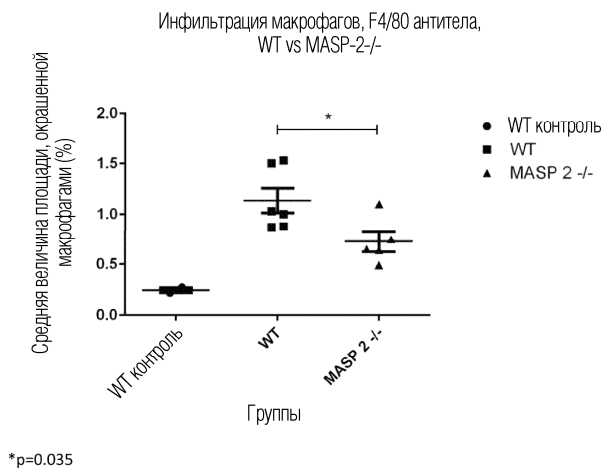
Общее количество белков, выведенных с мочой (24 часа)



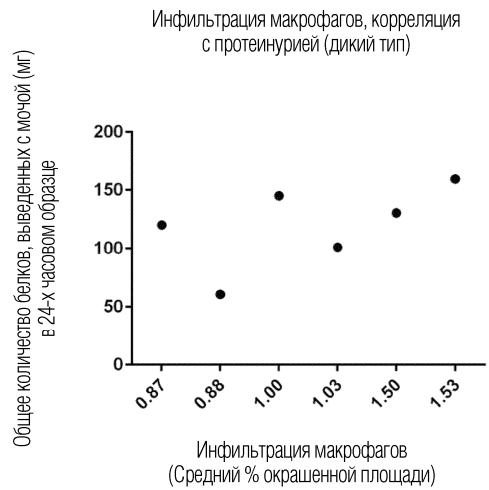
Фиг. 24



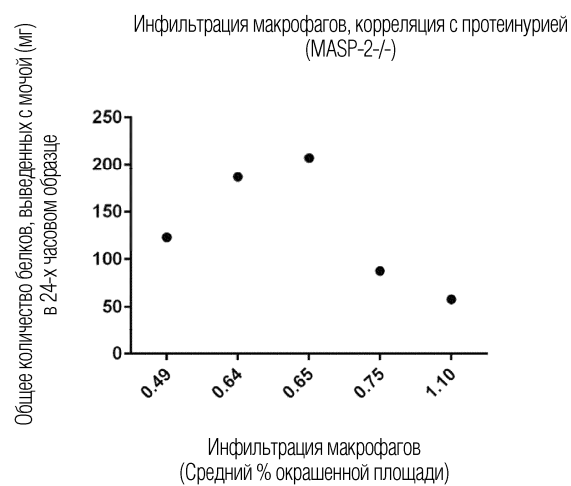
Фиг. 25



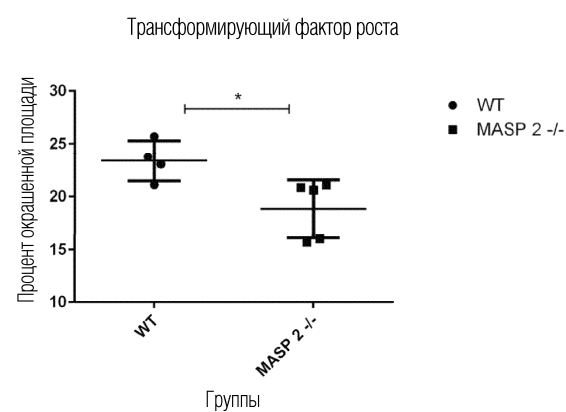
Фиг. 26



Фиг. 27А

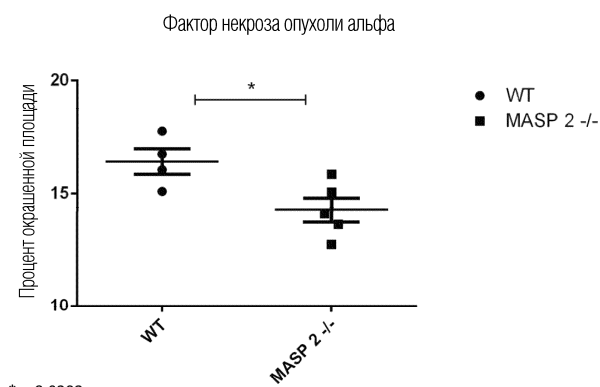


Фиг. 27В



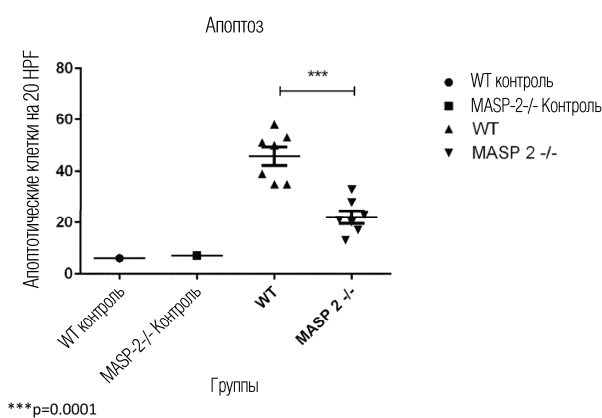
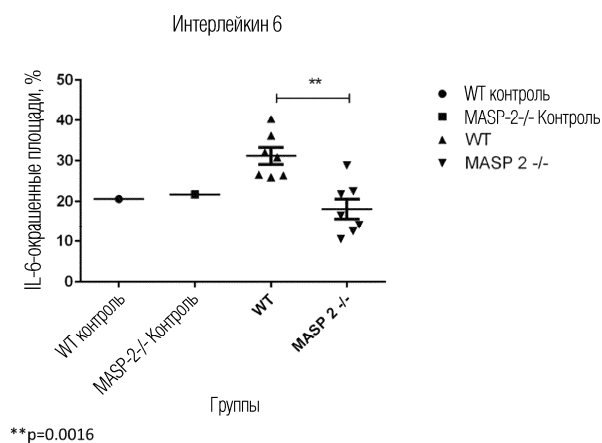
\*p=0.026

Фиг. 28

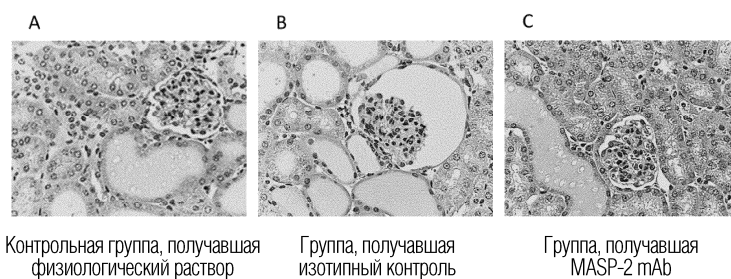


\*p=0.0303

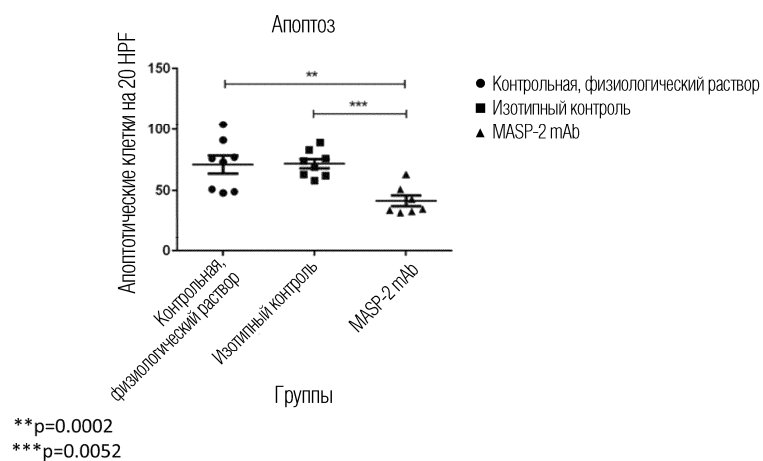
Фиг. 29

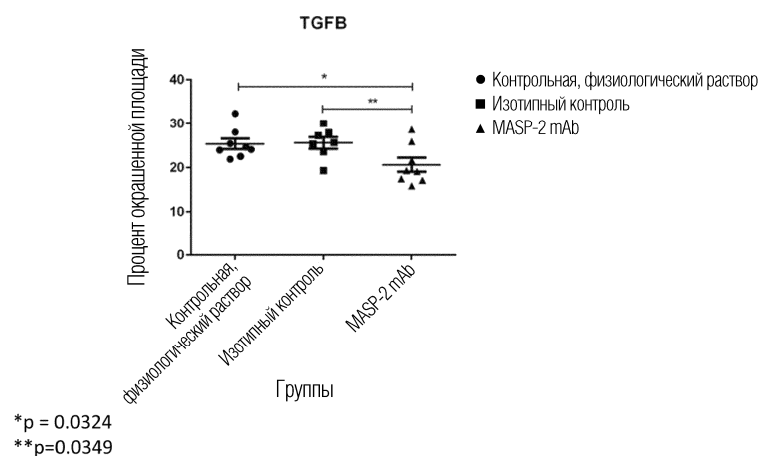


Патологические изменение, окрашивание H&E

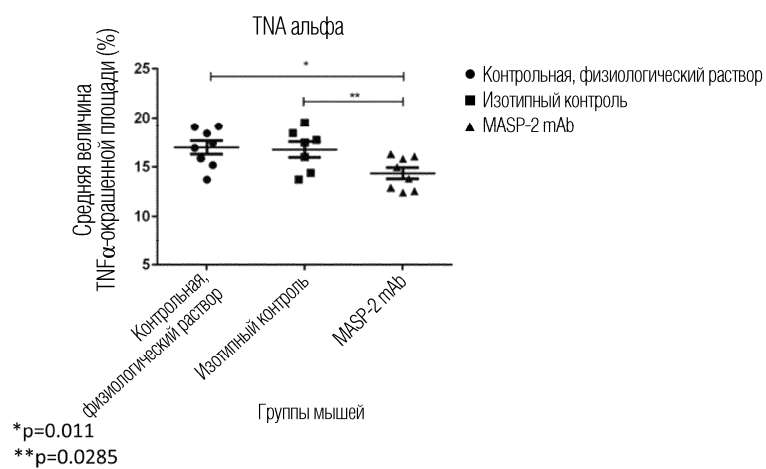


Фиг. 32

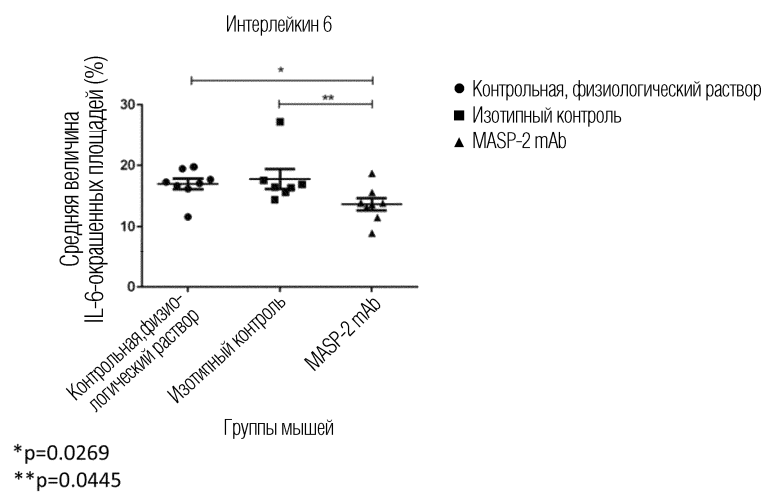




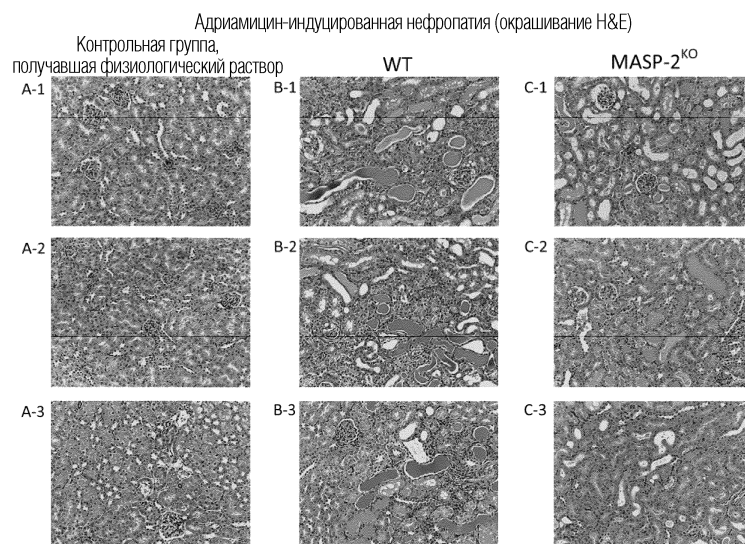
Фиг. 34



Фиг. 35

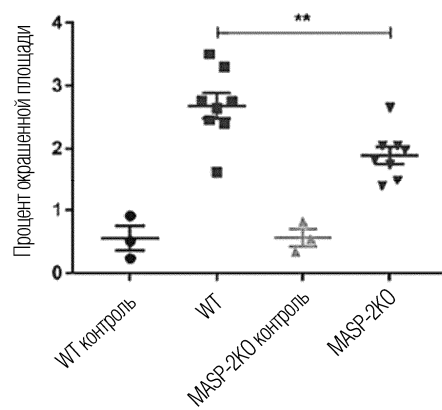


Фиг. 36



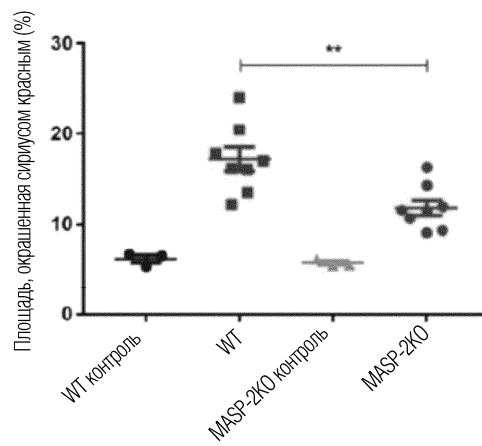
Фиг. 37

Инфильтрация макрофагов



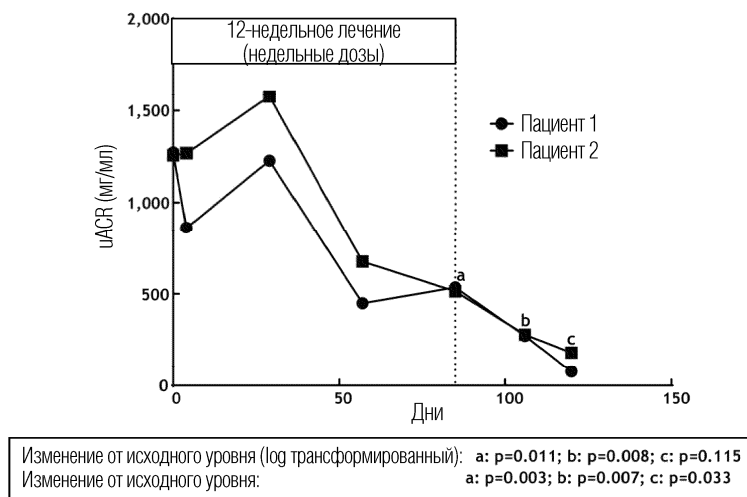
Фиг. 38

Отложение коллагена

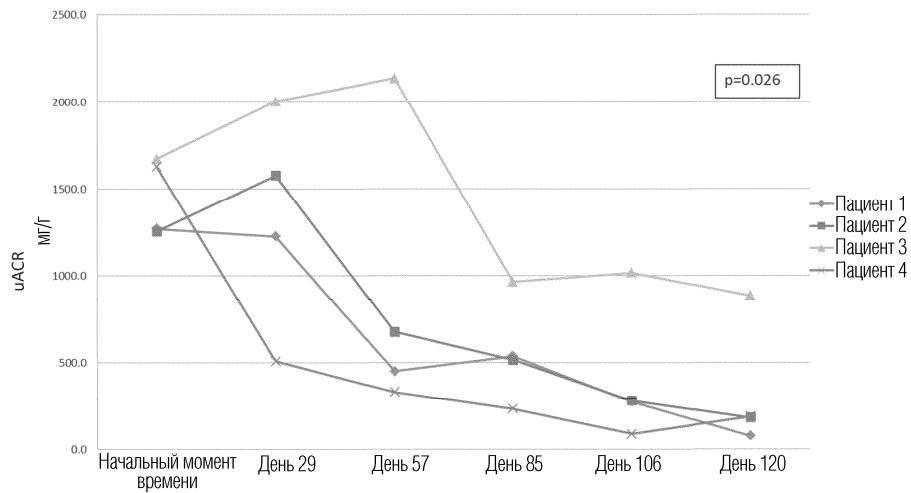


Фиг. 39

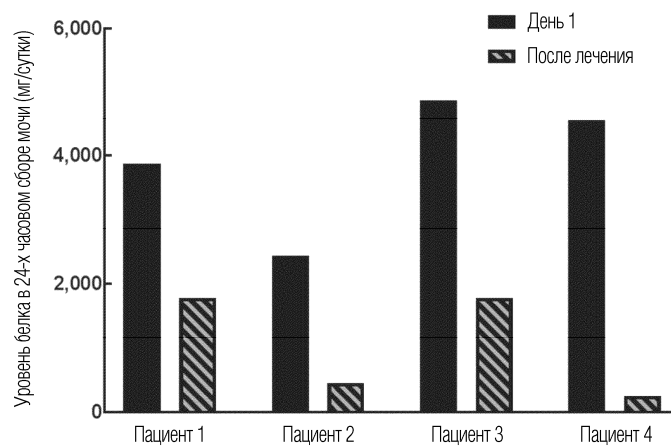
Альбумин/креатини отношение (uACR) у IgAN пациентов, получавших OMS646



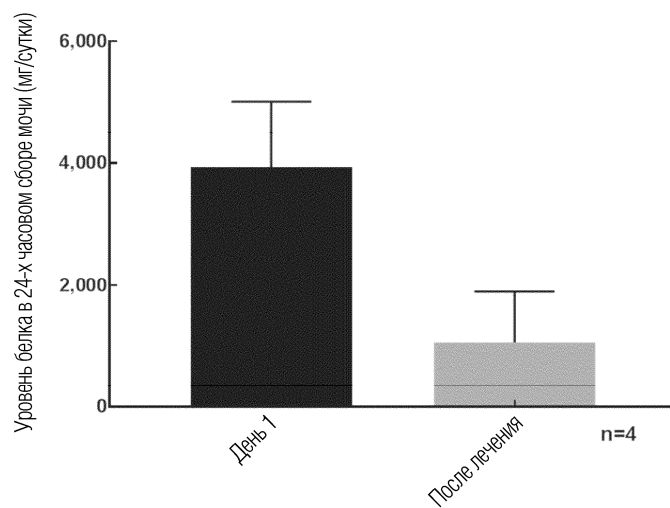
Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42



Фиг. 43

