

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390631 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.24(22) Дата подачи заявки
2021.08.17(51) Int. Cl. A61K 39/3955 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФАКТОРА D КОМПЛЕМЕНТА

(31) 63/066,948; 63/066,942; 63/197,833

(32) 2020.08.18; 2020.08.18; 2021.06.07

(33) US

(86) PCT/US2021/046250

(87) WO 2022/040149 2022.02.24

(71) Заявитель:
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

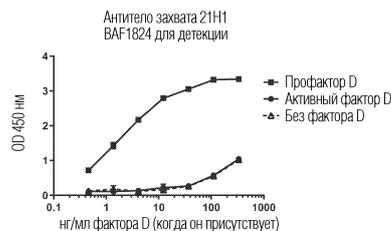
(72) Изобретатель:

Каммингз Уилльям Джейсон,
Фриман Джереми Э., Ли И, Шаффер
Кэтлин Э., Ябуки Мунехиса (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении описаны моноклональные антитела, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека и не связываются с профактором D человека, моноклональные антитела которые специфически связываются с профактором D человека и не связываются со зрелым фактором D человека, и моноклональные антитела, которые связываются как со зрелым фактором D человека, так и с профактором D человека. Также описаны способы применения моноклональных антител и композиций, содержащих их, для детекции зрелой формы и/или проформы фактора D в биологических образцах, для определения статуса альтернативного пути комплемента (APC) у млекопитающего или для определения статуса фактора D после лечения ингибирующим MASP-3 средством, которое ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D.



A1

202390631

202390631

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 577208EA/019

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФАКТОРА D КОМПЛЕМЕНТА ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 63/066942, поданной 18 августа 2020 года, предварительной заявке США № 63/066948, поданной 18 августа 2020 года, и предварительной заявке США № 63/197833, поданной 7 июня 2021 года, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам и композициям, содержащим такие антитела, для применения для детекции наличия и количества зрелого фактора D и профактора D.

УТВЕРЖДЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, прилагаемый к настоящей заявке, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включен в настоящее описание в качестве ссылки. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, имеет следующее наименование: MP_1_0316_PCT_Sequence_Listing_20210816_ST25. Текстовый файл имеет размер 139 кБайт; был создан 16 августа 2021 года и предоставлен через EFS-Web при подаче описания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента поддерживает врожденную защиту организма против патогенов, нарушение регуляции и незатихающая активность комплемента также могут служить в качестве основного пускового фактора аутоиммунных заболеваний, вызывая неконтролируемое развитие воспаления и разрушение тканей. Однако нарушение регуляции и незатихающая активность комплемента также могут служить в качестве основного пускового фактора заболевания, вызывая неконтролируемое развитие воспаления и разрушение тканей. Альтернативный путь комплемента (APC) в основном описывается как нижестоящий усилитель активности комплемента, усиливающий иммунный ответ организма-хозяина после активации комплемента через классический и лектиновый пути. Однако способность APC вызывать петлю положительной обратной связи из протеазных комплексов с активностью, которая запускает образование новых комплексов того же типа, является уникальной среди путей комплемента (Lachmann P.J, Adv Immunol 104:115-49, 2009).

Фактор D комплемента (CFD) представляет собой сериновую протеазу, которая необходима для активации APC. Фактор D расщепляет фактор В, связанный с C3b, образуя фермент C3b/Bb, который является активным компонентом конвертаз C3/C5 альтернативного пути. В то время как CFD экспрессируется в качестве неактивного профермента (упоминаемого в настоящем описании как "профактор D"), он циркулирует в

плазме преимущественно в качестве расщепленной зрелой сериновой протеазы (упоминаемой в настоящем описании как "зрелый фактор D"). Как описано в WO2013/180834 и WO2013/192240, недавно было определено, что MASP-3 ответственна за конвертирование фактора D комплемента (CFD) из проферментной формы белка (профактор D) в активную форму (зрелый фактор D), что, таким образом, делает белок MASP-3 ключевой вышестоящей регуляторной стадией APC. Как далее описано в WO2018/026722, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, были получены многочисленные высокоаффинные ингибиторные антитела против MASP-3, которые связывают домен сериновой протеазы MASP-3 и ингибируют его каталитическую активность.

Актуальной проблемой в области исследования комплемента является то, что антитела против фактора D в коммерчески-доступных тест-системах не различают профактор D и активную форму (зрелый фактор D). В плазме животных или человека дикого типа значительное большинство системного CFD уже процессировано в зрелую форму в результате активности MASP-3 *in vivo*, что делает оценку *in vitro* ингибирования APC ингибиторами MASP-3 с использованием традиционных способов анализа невозможной. Таким образом, существует потребность в реагентах для детекции и способах анализа для измерения присутствия и количества профактора D и/или зрелого фактора D в биологическом образце для применения в качестве биомаркера статуса APC и, тем самым, возможности оценки *in vitro* ингибирования APC ингибиторами MASP-3.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное описание сущности изобретения приводится для предоставления выбора концепций в упрощенной форме, которые далее описаны в Подробном описании. Это описание сущности изобретения не предназначено для указания на ключевые признаки заявленного в формуле изобретения объекта, а также не предназначено для применения для облегчения определения объема заявленного объекта.

Настоящее изобретение направлено на потребность в реагентах для детекции и способах анализа для определения наличия и количества профактора D и/или зрелого фактора D в биологическом образце.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом на N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислотной последовательности ILGGREA (SEQ ID NO:5). В одном варианте осуществления выделенное антитело или его фрагмент специфически связывается со зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3) и не связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2). В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR вариабельной области тяжелой цепи и/или CDR вариабельной области легкой цепи антитела или его фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4). В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2) и не связывается со зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3). В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR варибельной области тяжелой цепи и/или CDR варибельной области легкой цепи антитела или его фрагмента, которые специфически связывают профактор D человека.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору для детекции наличия или количества зрелого фактора D и/или профактора D в тестируемом образце, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер, и (b) по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека и/или профактор D.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и профактора D человека, где антитело содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, причем способ включает: (a) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом, специфичным к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающим фрагментом, в иммуноанализе *in vitro*; и (b) детекцию наличия, или отсутствия, или количества антитела или его фрагмента, связанного со зрелым фактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество зрелого фактора D в образце; где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D, указанным в качестве аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем способ включает: (a) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом, специфичным к профактору D человека, или его антигенсвязывающим фрагментом, в иммуноанализе *in vitro*; и (b) детекцию наличия или количества антитела или его фрагмента, связанного с профактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество профактора D в образце; где антитело, специфичное к зрелому

профактору D человека, или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом в активационном ("про") пептиде фактора D человека, указанном как "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки степени активации альтернативного пути комплемента (APC) в тестируемом образце, включающему: (a) предоставление тестируемого образца; (b) проведение иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из: (i) захвата и детекции зрелого фактора D в тестируемом образце, где зрелый фактор D либо захватывают, либо детектируют, с использованием моноклонального антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующим в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D; и/или (ii) захвата и детекции профактора D в тестируемом образце, где профактор D либо захватывается, либо детектируется, с использованием моноклонального антитела, специфичного к профактору D, или его фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связывается со зрелым фактором D; и (c) сравнения уровня зрелого фактора D, детектированного в соответствии с (b)(i), с заданным уровнем или контрольным образцом и/или сравнения уровня профактора D, детектированного в соответствии с (b)(ii), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень зрелого фактора D и/или профактора D, детектированный в тестируемом образце, указывает на степень активации альтернативного пути комплемента.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу мониторинга эффективности лечения ингибирующим MASP-3 антителом у млекопитающего, причем способ включает: (a) введение дозы ингибирующего MASP-3 антитела млекопитающему в первый момент времени; (b) оценку первой концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (a); (c) введение индивидууму ингибирующего MASP-3 антитела во второй момент времени; (d) оценку второй концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (c); и (e) сравнения уровня зрелого фактора D и/или профактора D, оцененного на стадии (b), с уровнем зрелого фактора D и/или профактора D, оцененным на стадии (d), для определения эффективности ингибирующего MASP-3 антитела у млекопитающего.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, включающему введение ингибирующего MASP-3 антитела индивидууму, если определено, что индивидуум имеет: (i) более низкий или сниженный уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем D или по сравнению с уровнем профактора D в одном или нескольких контрольных образцах; и/или (ii) более высокий или повышенный уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах,

полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем зрелого фактора D или по сравнению с уровнем зрелого фактора D в одном или нескольких контрольных образцах.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибирующее MASP-3 антитело в водном растворе, содержащем буферную систему, имеющую pH $6,0 \pm 5\%$, $20 \pm 5\%$ mM гистидин, $100 \pm 5\%$ мг/мл сахарозы и $0,035\% \pm 5\%$ полисорбата 80, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело включено в концентрации $110 \text{ мг/мл} \pm 5\%$, и где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к изделию, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую ингибирующее MASP-3 антитело, где ингибирующее MASP-3 антитело находится в единичной дозированной форме от 10 мг до 1000 мг, подходящей для терапевтического введения человеку.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеуказанные аспекты и многие из сопутствующих преимуществ настоящего изобретения станут более понятными с помощью приведенного ниже подробного описания совместно с прилагаемыми чертежами, где:

На фиг.1 представлена диаграмма, иллюстрирующая классический, лектиновый и альтернативный пути комплемента.

На фиг.2 приводятся аминокислотные последовательности (i) полноразмерного фактора D человека (SEQ ID NO:1), включающего сигнальную последовательность а.к. 1-19 (показанную курсивом) и активационный (про)пептид, который подчеркнут; (ii) профактор D человека (SEQ ID NO:2) с подчеркнутым пропептидом; и (iii) зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3).

На фиг.3 приведено выравнивание аминокислотных последовательностей профактора D из разных видов.

На фиг.4 графически проиллюстрировано титрование антисыворотки от репрезентативной мыши #2 после иммунизации пептидом, соответствующим N-концу зрелого фактора D человека, как описано в примере 1.

На фиг.5 графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с захватом, в котором гибридомные супернатанты подвергали скринингу в отношении связывания со зрелым фактором D человека или профактором D человека при захвате с использованием поликлонального антитела против фактора D AF1824 (R&D Systems), как описано в примере 1.

На фиг.6А графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с

использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека 1824 и с детекцией с использованием гибридного супернатанта 14A11, находящегося в каждом из условий, описанных в примере 1. Как показано на фиг.6А, гибридный супернатант 14A11 способен к селективной детекции рекомбинантного зрелого фактора D комплемента и не выявляет рекомбинантный профактор D, как описано в примере 1.

На фиг.6В графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека 1824 и с детекцией с использованием гибридного супернатанта 6G6, находящегося в каждом из условий, описанных в примере 1. Как показано на фиг.6В, гибридный супернатант 6G6 способен к селективной детекции рекомбинантного зрелого фактора D комплемента и не выявляет рекомбинантный профактор D, как описано в примере 1.

На фиг.6С графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека и с детекцией с использованием моноклонального антитела mAb1824 (R&D Systems), находящегося в каждом из условий, описанных в примере 1. Как показано на фиг.6С, моноклональное антитело 1824 (R&D Systems) выявляет как рекомбинантный зрелый CFD, так и рекомбинантный активный CFD, и, таким образом, неспособно к селективной детекции зрелого CFD относительно про-CFD, как описано в примере 1.

На фиг.7А представлено выравнивание аминокислот последовательностей переменной области тяжелой цепи (VH) для клонов, специфичных к зрелому фактору D человека: 6G6_VH (SEQ ID NO:12), 14A11_VH (SEQ ID NO:13), 27B3_VH (SEQ ID NO:14), 58F5_VH (SEQ ID NO:15), 49G3_VH (SEQ ID NO:16) и 10G1_VH (SEQ ID NO:17), как описано в примере 2.

На фиг.7В представлено выравнивание аминокислот последовательностей переменной области легкой цепи (VL) для клонов, специфичных к зрелому фактору D человека: 6G6_VK (SEQ ID NO:18), 14A11_VK: (SEQ ID NO:19), 27B3_VK: (SEQ ID NO:20), 58F5_VK: (SEQ ID NO:21), 49G3_VK: (SEQ ID NO:22) и 10G1_VK: (SEQ ID NO:23), как описано в примере 2.

На фиг.8 графически проиллюстрирована детекция (или ее отсутствие) рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с многочисленными антителами-кандидатами, специфичными к зрелому фактору D человека. Как показано на фиг.8, было обнаружено, что все протестированные очищенные антитела, а именно 6G6, 14A11, 10G1, 49G3, 27B3 и 58F5, являются специфичными к зрелой форме фактора D, как описано в примере 3.

На фиг.9 графически проиллюстрировано титрование сыворотки репрезентативной мыши #1189 после иммунизации зрелым фактором D человека в присутствии рекомбинантного зрелого фактора D или рекомбинантного профактора D. Как показано на фиг.9, сыворотка репрезентативной мыши #1189 содержит антитела, способные связываться как со зрелым фактором D, так и с профактором D, как описано в примере 4.

На фиг.10А представлено выравнивание аминокислот последовательностей

вариабельной области тяжелой цепи (VH) для клонов против фактора D человека: 3C5_VH (SEQ ID NO:85), 30H2_VH (SEQ ID NO:85), 11H1_VH (SEQ ID NO:86), 12H10_VH (SEQ ID NO:87) и 7H2_VH (SEQ ID NO:88), как описано в примере 5.

На фиг.10B представлено выравнивание аминокислот последовательностей вариабельной области легкой цепи (VL) для клонов против фактора D человека: 3C5_VL (SEQ ID NO:89), 30H2_VL (SEQ ID NO:90), 11H1_VL (SEQ ID NO:91), 12H10_VL (SEQ ID NO:92) и 7H2_VL (SEQ ID NO:93), как описано в примере 5.

На фиг.11A графически проиллюстрировано связывание рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с антителом-кандидатом против фактора D человека 3C5, демонстрирующее, что антитело 3C5 связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D, как описано в примере 5.

На фиг.11B графически проиллюстрировано связывание рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с антителом-кандидатом против фактора D человека 12H10, демонстрирующее, что антитело 12H10 связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D, как описано в примере 5.

На фиг.12A графически иллюстрируются результаты анализа ELISA, в котором рекомбинантным антителом против фактора D 3C5 покрывали планшет для ELISA, и позволяли ему захватывать рекомбинантный зрелый фактор D и профактор D человека и яванского макака (huMat CFD, cy Mat CFD, huProCFD и cyPro CFD). Также проводился захват в сыворотке с истощенным фактором D (сыворотка CFD Dpl) и образце объединенной нормальной плазмы яванского макака (NCP). Детекцию захваченного фактора D проводили с использованием версии Fc IgG2a mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека, как описано в примере 6.

На фиг.12B графически иллюстрируются результаты анализа ELISA, в котором рекомбинантным антителом против фактора D 12H10 покрывали планшет для ELISA, и позволяли ему захватывать рекомбинантный зрелый фактор D и профактор D человека и яванского макака (huMat CFD, cy Mat CFD, huProCFD и cyPro CFD). Также проводился захват для сыворотки с истощенным фактором D (сыворотка CFD Dpl) и образца объединенной нормальной плазмы яванского макака (NCP). Детекцию захваченного фактора D проводили с использованием версии Fc IgG2a mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека, как описано в примере 6.

На фиг.13 графически иллюстрируется детекция зрелого фактора D и профактора D человека и яванского макака посредством комбинации антитела захвата 3C5 (против фактора D человека/яванского макака) и антитела детекции 14A11 (специфичное к зрелому фактору D человека/яванского макака) в анализе ELISA, как описано в примере 6.

На фиг.14 графически иллюстрируется титрование сыворотки репрезентативной мыши #2 после иммунизации синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотным остаткам 26-32 фактора D компонента человека: "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), в присутствии рекомбинантного зрелого фактора D или рекомбинантного профактора D. Как показано на фиг.14, сыворотка репрезентативной мыши #2 содержит

антитела, способные селективно связываться со зрелым фактором D относительно профактора D, как описано в примере 7.

На фиг.15 графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с захватом, в котором проводился скрининг гибридомных супернатантов в отношении связывания с профактором D человека или зрелым фактором D человека при захвате с использованием поликлонального антитела против фактора D AF1824 (R&D Systems), как описано в примере 7.

На фиг.16А представлено выравнивание аминокислот последовательностей варибельной области тяжелой цепи (VH) для клонов, специфичных к профактору D человека: 18F5_VH (SEQ ID NO:136), 1F9_VH (SEQ ID NO:137), 2A4_VH (SEQ ID NO:138), 20A1_VH (SEQ ID NO:139), 13A10_VH (SEQ ID NO:140) и 21H1_VH (SEQ ID NO:141), как описано в примере 8.

На фиг.16В представлено выравнивание аминокислот для последовательностей варибельной области легкой цепи (VL) для клонов, специфичных к профактору D человека: 18F5_VK (SEQ ID NO:142), 1F9_VK (SEQ ID NO:143), 2A4_VK (SEQ ID NO:144), 20A1_VK (SEQ ID NO:145), 13A10_VK (SEQ ID NO:146) и 21H1_VK (SEQ ID NO:147), как описано в примере 8.

На фиг.17А графически проиллюстрирована детекция рекомбинантного профактора D человека с многочисленными антителами-кандидатами, специфичными к профактору D человека. Как показано на фиг.17А, все протестированные очищенные антитела, а именно: 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, были способны к детекции формы фактора D, как описано в примере 9.

На фиг.17В графически иллюстрируется детекция рекомбинантного зрелого фактора D человека с использованием многочисленных антител-кандидатов, специфичных к профактору D человека. Как показано на фиг.17В, ни одно из протестированных очищенных антител, а именно, 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, не было способно к детекции зрелой формы фактора D, как описано в примере 9.

На фиг.18 графически иллюстрируется детекция профактора D и зрелого фактора D в анализе ELISA с использованием антитела против профактора D 21H1 в качестве антитела захвата и поликлонального антитела козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции, как описано в примере 9.

На фиг.19 графически проиллюстрирована детекция профактора D и зрелого фактора D в нормальной плазме человека (NHP), нормальной сыворотке человека (NHS) или сыворотке с истощением фактора D (сыворотка Df-Dpl), с использованием анализа ELISA а антителом против профактора D 21H1 в качестве антитела захвата и поликлонального антитела козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции, как описано в примере 9.

На фиг.20 графически иллюстрируется количество профактора D в нормальной сыворотке человека (NHS), сыворотке с истощением C1q (C1q-Dpl), сыворотке с истощением фактора D (Df-Dpl) и сыворотке пациента с синдромом ЗМС при

определении в анализе ELISA с антителом 21H1 против профактора D в качестве антитела захвата и поликлональным антителом козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции, как описано в примере 9.

На фиг.21A графически иллюстрируется количество зрелого фактора D у яванского макака на протяжении периода 912 часов после введения репрезентативного mAb13B1 против MASP-3, как описано в примере 11.

На фиг.21B графически иллюстрируется стандартная кривая, полученная из 4-параметрической логистической кривой для разведений рекомбинантного зрелого фактора D яванского макака, как описано в примере 11.

На фиг.22A графически иллюстрируется концентрация зрелого фактора D у обезьян на протяжении периода времени 1344 часа после подкожного (п/к) или внутривенного (в/в) введения mAb 13B1 против MASP-3, при определении в анализе с использованием ELISA с антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D, как описано в примере 12.

На фиг.22B графически иллюстрируется активность альтернативного пути *ex vivo* (% от исходного уровня) на протяжении периода времени 1344 часа после введения mAb13B1 против MASP-3 при определении в анализе с фактором Ba, как описано в примере 12.

На фиг.23 графически иллюстрируется взаимосвязь PD-PD для эффектов mAb13B1 против MASP-3 на активность альтернативного пути *ex vivo* и концентрации зрелого фактора D после однократного внутривенного болюса или подкожного введения у обезьян, как описано в примере 12.

На фиг.24 графически иллюстрируется взаимосвязь PK-PD для дозировки mAb13B1 против MASP-3 и эффекта на зрелый фактор D (% от исходного уровня), как описано в примере 12.

На фиг.25A графически иллюстрируется концентрация mAb13B1 в сыворотке индивидуумов на протяжении периода времени вплоть до 84 суток после внутривенного (в/в) введения mAb13B1 при определении посредством ELISA, как описано в примере 13.

На фиг.25B графически иллюстрируются уровни зрелого фактора D у индивидуумов на протяжении периода времени 84 суток после внутривенного (в/в) введения mAb 13B1 против MASP-3 при определении в анализе ELISA с антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D, использованным в качестве антитела детекции, как описано в примере 13.

ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 аминокислотная последовательность полноразмерного фактора D человека (включая сигнальную последовательность)

SEQ ID NO:2 аминокислотная последовательность профактора D человека (без сигнальной последовательности)

SEQ ID NO:3: аминокислотная последовательность зрелого фактора D человека

SEQ ID NO:4 пропептид человека "APPRGR", соответствующий остаткам 20-25

полноразмерного фактора D человека.

SEQ ID NO:5 N-концевой пептид ("ILGGREA") зрелого фактора D человека, соответствующий остаткам 1-7 зрелого фактора D человека.

SEQ ID NO:6 синтетический конъюгат пептид ILGGREA-KLH "ILGGREAGPGPGAQKVFVAAAATLKAATAKKS"

SEQ ID NO:7: белок MASP-3 человека

SEQ ID NO:8: полноразмерный фактор D макака

SEQ ID NO:9: полноразмерный фактор D собачьих

SEQ ID NO:10: полноразмерный фактор D крыс

SEQ ID NO:11: полноразмерный фактор D мышей

mAb, специфичные к зрелому фактору D человека: VH-цепи

SEQ ID NO:12: аминокислотная последовательность VH mAb клона 6G6

SEQ ID NO:13: аминокислотная последовательность VH mAb клона 14A11

SEQ ID NO:14: аминокислотная последовательность VH mAb клона 27B3

SEQ ID NO:15: аминокислотная последовательность VH mAb клона 58F5

SEQ ID NO:16: аминокислотная последовательность VH mAb клона 49G3

SEQ ID NO:17: аминокислотная последовательность VH mAb клона 10G1

mAb, специфичные к зрелому фактору D человека: VL-цепи

SEQ ID NO:18: аминокислотная последовательность VL mAb клона 6G6

SEQ ID NO:19: аминокислотная последовательность VL mAb клона 14A11

SEQ ID NO:20: аминокислотная последовательность VL mAb клона 27B3

SEQ ID NO:21: аминокислотная последовательность VL mAb клона 58F5

SEQ ID NO:22: аминокислотная последовательность VL mAb клона 49G3

SEQ ID NO:23: аминокислотная последовательность VL mAb клона 10G1

SEQ ID NO:24-48: FR и CDR тяжелой цепи из mAb мыши, специфичных к зрелому фактору D человека

SEQ ID NO:49-64 FR и CDR легкой цепи из mAb мыши, специфичных к зрелому фактору D человека

SEQ ID NO:65-69: консенсусные последовательности CDR из mAb мыши, специфичных к зрелому фактору D человека

SEQ ID NO:70: константная область IgG4 человека

SEQ ID NO:71: константная область IgG4 человека с мутацией S228P

SEQ ID NO:72: константная область IgK человека

SEQ ID NO:73: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 6G6

SEQ ID NO:74: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 14A11

SEQ ID NO:75: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 27B3

SEQ ID NO:76: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 58F5

SEQ ID NO:77: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 49G3

SEQ ID NO:78: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 10G1

- SEQ ID NO:79: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 6G6
- SEQ ID NO:80: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 14A11
- SEQ ID NO:81: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 27B3
- SEQ ID NO:82: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 58F5
- SEQ ID NO:83: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 49G3
- SEQ ID NO:84: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 10G1
- mAb против фактора D человека (с-конец): VH-цепи
- SEQ ID NO:85: аминокислотная последовательность VH mAb клона 3C5
- SEQ ID NO:86: аминокислотная последовательность VH mAb клона 11H1
- SEQ ID NO:87: аминокислотная последовательность VH mAb клона 12H10
- SEQ ID NO:88: аминокислотная последовательность VH mAb клона 7H2
- mAb против фактора D человека (с-конец): VL-цепи
- SEQ ID NO:89: аминокислотная последовательность VL mAb клона 3C5
- SEQ ID NO:90: аминокислотная последовательность VL mAb клона 30H2
- SEQ ID NO:91: аминокислотная последовательность VL mAb клона 11H1
- SEQ ID NO:92: аминокислотная последовательность VL mAb клона 12H10
- SEQ ID NO:93: аминокислотная последовательность VL mAb клона 7H2
- SEQ ID NO:94-109: FR и CDR тяжелой цепи из mAb мыши против фактора D человека, которое связывает эпитоп, общий для зрелого фактора D и профактора D
- SEQ ID NO:110-126: FR и CDR легкой цепи из mAb мыши против фактора D человека, которое связывает эпитоп, общий для зрелого фактора D и профактора D
- SEQ ID NO:127: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область 3C5 HC и 30H2
- SEQ ID NO:128: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VH 11H1
- SEQ ID NO:129: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VH 12H10
- SEQ ID NO:130: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VH 7H2
- SEQ ID NO:131: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VL 3C5
- SEQ ID NO:132: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VL 30H2
- SEQ ID NO:133: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VL 11H1
- SEQ ID NO:134: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VL 12H10
- SEQ ID NO:135: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область VL 7H2
- mAb, специфичные к профактору D человека: VH-цепи
- SEQ ID NO:136: аминокислотная последовательность VH mAb клона 18F5
- SEQ ID NO:137: аминокислотная последовательность VH mAb клона 1F9

- SEQ ID NO:138: аминокислотная последовательность VH mAb клона 2A4
- SEQ ID NO:139: аминокислотная последовательность VH mAb клона 20A1
- SEQ ID NO:140: аминокислотная последовательность VH mAb клона 13A10
- SEQ ID NO:141: аминокислотная последовательность VH mAb клона 21H1VH
mAb, специфичные к профактору D человека: VL-цепи
- SEQ ID NO:142: аминокислотная последовательность VL mAb клона 18F5
- SEQ ID NO:143: аминокислотная последовательность VL mAb клона 1F9
- SEQ ID NO:144: аминокислотная последовательность VL mAb клона 2A4
- SEQ ID NO:145: аминокислотная последовательность VL mAb клона 20A1
- SEQ ID NO:146: аминокислотная последовательность VL mAb клона 13A10
- SEQ ID NO:147: аминокислотная последовательность VL mAb клона 21H1
- SEQ ID NO:148-174: FR и CDR тяжелой цепи из mAb мыши, специфичных к профактору D человека
- SEQ ID NO:175-200: FR и CDR легкой цепи из mAb мыши, специфичных к профактору D человека
- SEQ ID NO:201-205: консенсусные последовательности CDR из mAb мыши, специфичных к профактору D человека
- SEQ ID NO:206 нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 18F5
- SEQ ID NO:207 нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 1F9
- SEQ ID NO:208: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 2A4
- SEQ ID NO:209: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC
20A1
- SEQ ID NO:210: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC
13A10
- SEQ ID NO:211: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC
21H1
- SEQ ID NO:212 нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC 18F5
- SEQ ID NO:213 нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC 1F9
- SEQ ID NO:214: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC 2A4
- SEQ ID NO:215: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC
20A1
- SEQ ID NO:216: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC
13A10
- SEQ ID NO:217: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область LC
21H1
- SEQ ID NO:218: константная область IgG2a мыши
- SEQ ID NO:219: константная область легкой цепи каппа мыши
- Ингибиторные mAb против MASP-3 человека
- SEQ ID NO:220: h4D5_VH-14_VH
- SEQ ID NO:221: h4D5_VL-1-NA

SEQ ID NO:222: h4D5_VH-19
 SEQ ID NO:223: h10D12_VH-45
 SEQ ID NO:224: h10D12_VL-21-GA
 SEQ ID NO:225: h10D12_VH-49
 SEQ ID NO:226: h13B1_VH-9
 SEQ ID NO:227: h13B1_VL-1-NA
 SEQ ID NO:228: h13B1_VH-10
 SEQ ID NO:229: HC-CDR1 h4D5: 14_1 NA
 SEQ ID NO:230: HC-CDR1 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:231: HC-CDR1 h13B1-9-1-NA
 SEQ ID NO:232: HC-CDR2 h4D5: 14_1 NA
 SEQ ID NO:233: HC-CDR2 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:234: HC-CDR2 h13B1-9-1-NA
 SEQ ID NO:235: HC-CDR2 h13B1-10-1-NA:
 SEQ ID NO:236: HC-CDR3 h4D5: 14_1 NA
 SEQ ID NO:237: HC-CDR3 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:238: HC-CDR3 h13B1-9-1-NA
 SEQ ID NO:239: LC-CDR1 h4D5: 14_1 NA
 SEQ ID NO:240: LC-CDR1 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:241: LC-CDR2 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:242: LC-CDR3 h4D5: 14_1 NA
 SEQ ID NO:243: LC-CDR3 h10D12-45-21-GA
 SEQ ID NO:244: LC-CDR3 h13B1-9-1-NA
 SEQ ID NO:245: константная область IgG4 человека с мутацией S228P и X
 SEQ ID NO:246: аминокислотная последовательность HC_FR3 mAb клона 7H2
 SEQ ID NO:247: аминокислотная последовательность HC_FR1 mAb клона 2A4
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Как описано в примерах 1-3, были получены моноклональные антитела, которые специфически связываются с N-концевой областью зрелого фактора D человека и которые не связываются с профактором D. Как более подробно описано в примерах 8-9, были получены моноклональные антитела, которые специфически связываются с пропептидом профактора D и не связываются со зрелым фактором D. Моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, и антитела, специфичные к профактору D, являются пригодными для детекции зрелой и/или проформы фактора D в биологических образцах и могут использоваться для определения статуса альтернативного пути комплемента (APC) у млекопитающего. Как более подробно описано в примерах 10-12, моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, также могут использоваться для определения статуса фактора D после лечения ингибирующим MASP-3 средством, которое ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным

антителам, которые специфически связываются с N-концевой областью зрелого фактора D человека, и к применению этих антител в способах детекции наличия или количества зрелого фактора D в биологическом образце. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с активационным (про)пептидом профактора D и к применению этих антител в способах детекции наличия или количества профактора D в биологическом образце. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению моноклональных антител, специфичных к зрелому фактору D, и/или к применению моноклональных антител, специфичных к профактору D, для определения наличия или количества зрелого фактора D и/или профактора D у млекопитающего до и после лечения ингибирующим MASP-3 средством, таким как высокоаффинное ингибирующее MASP-3 антитело, где ингибирующее MASP-3 антитело способно ингибировать конвертирование профактора D в зрелый фактор D и, тем самым, ингибировать APC.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если в настоящем описании не определено конкретно, все термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое подразумевает специалист в области настоящего изобретения. Представленные ниже определения приведены для прояснения терминов, используемых в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Эти термины хорошо понятны специалистам в данной области и относятся к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, которые специфически связывают антиген. Одна из форм антитела представляет собой основную структурную единицу антитела. Эта форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей антител, причем каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные области легких и тяжелых цепей вместе отвечают за связывание антигена и константные области отвечают за эффекторные функции антитела.

Как используют в рамках изобретения, термин "антитело" охватывает антитела и их фрагменты, происходящие из любого продуцирующего антитела млекопитающего (например, мышь, крыса, кролик и примат, в том числе человек), или полученные способами гибридом, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии или с использованием трансгенных животных (или другими способами продуцирования антител или фрагментов антител), которые специфически связываются с антигеном, таким как профактор D человека, указанный под SEQ ID NO:2 (например, эпитоп в пропептиде "APPRGR", указанный под SEQ ID NO:4), или зрелый фактор D человека, указанный под SEQ ID NO:3 (например, эпитоп на N-конце зрелого фактора D, содержащий или состоящий из "ILGGREA", указанный под SEQ ID NO:5), или которые связываются с эпитопом, общим для профактора D человека и зрелого фактора D человека (например, эпитоп на C-концевой области фактора D (например, аминокислоты 8-228 SEQ ID NO:3)).

Подразумевается, что термин "антитело" не ограничивается в отношении источника антитела или способа, посредством которого оно получено (например, способ гибридом, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, с использованием трансгенного животного, пептидного синтеза и т.д.). Иллюстративные антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела); гуманизированные антитела; полностью человеческие антитела, антитела мыши; химерные моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека; и антиидиотипические антитела, и они могут представлять собой интактную молекулу или ее фрагмент. Как используют в рамках изобретения, термин "антитело" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), их одноцепочечные (ScFv), синтетические варианты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, содержащие антительную часть с антигенсвязывающим фрагментом требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий центр или фрагмент (распознающий эпитоп участок) требуемой специфичности.

Как используют в рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту, который содержит по меньшей мере одну CDR тяжелых и/или легких цепей антитела, которая специфически связывается с антигеном, таким как профактор D человека, указанный под SEQ ID NO:2 (например, эпитоп в пропептиде "APPRGR", указанный под SEQ ID NO:4), или зрелый фактор D человека, указанный под SEQ ID NO:3 (например, эпитоп на N-конце зрелого фактора D, содержащий или состоящий из "ILGGREA", указанный под SEQ ID NO:5), или эпитоп, общий для профактора D человека и зрелого фактора D человека (например, эпитоп на C-концевой области фактора D (например, аминокислоты 8-228 SEQ ID NO:3)). Соответственно, антигенсвязывающий фрагмент описанных в настоящем описании антител может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR последовательности VH и VL, такие как 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CRS последовательностей VH и VL описанных антител против фактора D человека, указанных в настоящем описании.

Как используют в рамках изобретения термин "моноклональные антитела против фактора D" относится к однородной совокупности антител, где моноклональное антитело содержит аминокислоты, которые вовлечены в селективное связывание эпитопа на факторе D человека, таком как профактор D человека, указанный под SEQ ID NO:2 (например, эпитоп в пропептиде "APPRGR" указанный под SEQ ID NO:4), или которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, указанным под SEQ ID NO:3 (например, эпитоп на N-конце зрелого фактора D, содержащий или состоящий из "ILGGREA", указанный под SEQ ID NO:5), или которые связываются с эпитопом, общим для профактора D человека и зрелого фактора D человека (например, эпитоп на C-концевой области фактора D (например, аминокислоты 8-228 SEQ ID NO:3)). Термин

"моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (эпитоп-распознающий центр) с требуемой специфичностью и способностью связываться с эпитопом.

Как используют в рамках изобретения, определение "моноклональные" указывает на тот признак антитела, что оно получено из по существу однородной совокупности антител, и подразумевается, что оно не ограничено источником антитела или способом, посредством которого оно получено (например, способом гибридом, фаговой селекцией, рекомбинантной экспрессии, с использованием трансгенных животных и т.д.). Этот термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше, входящие в определение "антитело". Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любого способа, который обеспечивает продуцирование молекул антител стабильными клеточными линиями в культуре, такого как способ гибридом, описанный Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975, или они могут быть получены способами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567, выданный Cabilly). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991, и Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, и любому их подклассу.

Общепризнанные полипептиды иммуноглобулинов включают легкие цепи каппа и лямбда и тяжелые цепи альфа, гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эpsilon и мю, или эквиваленты в других видах. Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулинов (массой приблизительно 25 кДа или длиной приблизительно 214 аминокислот) содержат переменную область приблизительно из 110 аминокислот на NH₂-конце и константную область каппа или лямбда на COOH-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулинов (массой приблизительно 50 кДа или длиной приблизительно 446 аминокислот) аналогично содержат переменную область (приблизительно из 116 аминокислот) и одну из вышеупомянутых константных областей тяжелой цепи, например, гамма (приблизительно из 330 аминокислот).

Основная единица антитела с четырьмя цепями представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. IgM-антитело состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, таким образом, содержит 10 антигенсвязывающих центров. Секретируемые IgA-антитела могут полимеризоваться с образованием поливалентных ансамблей, содержащих 2-5 основных

4-цепочечных единиц вместе с J-цепью. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет внутривещечные дисульфидные связи через регулярные интервалы. Спаривание VH и VL образует единый антигенсвязывающий центр.

Каждая H-цепь имеет на N-конце переменный домен (VH), за которым следует три константных домена (CH) для каждой из α - и γ -цепей, и четыре CH-домена (CH) для изотипов μ и ϵ .

Каждая L-цепь имеет на N-конце переменный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на его другом конце. VL расположена параллельно VH и CL расположена параллельно первому константному домену тяжелой цепи (CH1). L-цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко обособленных типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов (CL).

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH), иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые имеют тяжелые цепи, обозначаемые как альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), соответственно. Классы γ и α далее подразделяют на подклассы на основе незначительных отличий последовательности и функции CH, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Для структуры и свойств различных классов антител, см., например, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds); Appleton and Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6.

Термин "переменный" относится к тому факту, что последовательности определенных сегментов V-доменов значительно различаются среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако переменность неравномерно распределена по длине переменных доменов из 110 аминокислот. Вместо этого, V-области состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной переменности, называемыми "гиперпеременными областями", каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-слоя, соединенных тремя гиперпеременными областями, которые формируют петли, соединяющие структуры бета-слоев и в некоторых случаях образующие их часть. Гиперпеременные области в каждой цепи удерживаются вблизи друг от друга посредством FR и с гиперпеременными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего центра антител (см. Kabat, et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Как используют в рамках изобретения, термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (т.е. приблизительно из остатков 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) вариабельного домена легкой цепи и приблизительно из остатков 31-35 (H1), 50-66 (H2) и 95-102 (H3) вариабельного домена тяжелой цепи при нумерации в соответствии с системой нумерации Kabat, как описано в Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)); и/или остатки из "гипервариабельной петли" (т.е. остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи при нумерации в соответствии с системой нумерации Chothia, как описано в Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); и/или остатки из "гипервариабельной петли"/CDR (например, остатки 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-120 (L3) в VL, и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-120 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc, J.P., et al., Nucleic Acids Res 27:209-212; Ruiz, M., et al., Nucleic Acids Res 28:219-221 (2000)).

Как используют в рамках изобретения, термин "фрагмент антитела" относится к части, происходящей из или родственной полноразмерному антителу против фактора D, обычно включающей его антигенсвязывающую или вариабельную область. Иллюстративные примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител, биспецифические и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Как используют в рамках изобретения, фрагмент антитела "одноцепочечный Fv" или "scFv" содержит домены V_H и V_L антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который позволяет scFv формировать требуемую структуру для связывания антигена. См. Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). "Fv" является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный антиген-распознающий и связывающий центр. Этот фрагмент состоит из димера одного домена вариабельной области тяжелой цепи и одного домена вариабельной области легкой цепи в прочной нековалентной ассоциации. В результате укладки этих двух доменов образуется шесть гипервариабельных петель (по три петли из H-цепи и L-цепи), которые предоставляют аминокислотные остатки для связывания антигена и сообщают антителу специфичность связывания антигена. Однако даже один

вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с меньшей аффинностью, чем у целого связывающего центра.

Как используют в рамках изобретения, "гуманизированное антитело" представляет собой химерную молекулу, обычно получаемую с использованием рекомбинантных способов, имеющую антигенсвязывающий центр, происходящий из иммуноглобулина из не являющегося человеком вида, и остальную иммуноглобулиновую структуру молекулы, основанную на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий центр может содержать либо полные вариабельные области, слитые с константными доменами, либо только CDR, трансплантированные в соответствующие каркасные области вариабельных доменов. Эпитоп-связывающие центры могут быть дикого типа или могут быть модифицированы посредством одной или нескольких аминокислотных замен. Другой подход фокусируется не только на предоставлении константных областей человеческого происхождения, но также на модификации вариабельных областей, а также реконструировании для максимально возможного сходства с человеческой формой. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела сохраняют последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антител мыши). В других вариантах осуществления гуманизированные антитела имеют одну или несколько CDR (одна, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела, которые также называются одной или несколькими CDR, "происходящими из" одной или нескольких CDR исходного антитела.

Как используют в рамках изобретения, термин "специфическое связывание" относится к способности антитела предпочтительно связываться с конкретным анализируемым компонентом, который присутствует в однородной смеси разных анализируемых компонентов. В определенных вариантах осуществления специфическое связывающее взаимодействие различает желаемые и нежелаемые анализируемые компоненты в образце, в некоторых вариантах осуществления более чем приблизительно в 10-100 раз или более (например, более чем приблизительно в 1000 или 10000 раз). В определенных вариантах осуществления аффинность между агентом захвата и анализируемым компонентом, когда они специфически связаны в комплекс агент захвата/анализируемый компонент, характеризуется K_D (константа диссоциации) менее чем приблизительно 100 нМ, или менее чем приблизительно 50 нМ, или менее чем приблизительно 25 нМ, или менее чем приблизительно 10 нМ, или менее чем приблизительно 5 нМ, или менее чем приблизительно 1 нМ.

Как используют в рамках изобретения, термин "вариант" антитела относится к молекуле, аминокислотная последовательность которой отличается от аминокислотной последовательности "родительского" или эталонного антитела посредством вставки, делеции и/или замены одного или нескольких аминокислотного остатка(ов) в последовательности родительского антитела. В одном варианте осуществления вариант

антитела против фактора D относится к молекуле, которая содержит переменные области, которые идентичны родительским переменным доменам, за исключением комбинации всего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен в областях CDR переменной области тяжелой цепи, и/или вплоть до комбинации всего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен в указанных областях CDR переменной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные модификации последовательности.

Как используют в рамках изобретения, термин "родительское антитело" относится к антителу, которое кодируется аминокислотной последовательностью, используемой для получения варианта. Предпочтительно, родительское антитело имеет каркасную область человека и, при их наличии, имеет константную область(и) антитела человека. Например, родительское антитело может представлять собой гуманизованное или полностью человеческое антитело.

Как используют в рамках изобретения, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его природного окружения. Контаминирующие компоненты природного окружения представляют собой материалы, которые будут препятствовать диагностическим или терапевтическим применениям антитела, и они могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные соединения. В предпочтительных вариантах осуществления антитело очищают (1) до более 95% по массе антитела при определении способом Лоури, и наиболее предпочтительно до более 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до гомогенности согласно SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела не присутствует. Однако обычно выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

Как используют в рамках изобретения, термин "эпитоп" относится к части антигена, с которой специфически связывается моноклональное антитело. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют определенные характеристики трехмерной структуры, а также определенные зарядовые характеристики. Более конкретно, термин "эпитоп профактора D", как используют в рамках изобретения, относится к части соответствующего полипептида (SEQ ID NO:4), с которой антитело иммуноспецифически связывается при определении любым способом, известным в данной области, например, посредством иммуноанализа. Термин "зрелый эпитоп фактора D", как используют в рамках изобретения, относится к эпитопу, охватывающему N-концевую часть соответствующего полипептида (SEQ ID NO:3), например, к эпитопу на

N-конце зрелого фактора D, содержащему или состоящему из "ILGGREA", указанного под SEQ ID NO:5, с которым антитело иммуноспецифически связывается при определении любым способом, известным в данной области, например, способами иммуноанализа. Термин "эпитоп, общий для профактора D и зрелого фактора D", как используют в рамках изобретения, относится к эпитопу на C-концевой области, являющемуся общим для профактора D и зрелого фактора D (например, аминокислоты 8-228 SEQ ID NO:3), с которым антитело иммуноспецифически связывается при определении любым способом, хорошо известным в данной области, например, способом иммуноанализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными. Такие эпитопы могут быть линейными по своей природе или могут представлять собой прерывающийся эпитоп. Таким образом, как используют в рамках изобретения, термин "конформационный эпитоп" относится к прерывающемуся эпитопу, образованному посредством пространственных взаимоотношений аминокислот антигена, отличных от непрерывной последовательности аминокислот.

Как используют в рамках изобретения, "млекопитающее" включает, но не ограничивается ими, людей, не являющихся человеком приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

Как используют в рамках изобретения, термин "биологический образец" включает, но не ограничивается ими, кровь, плазму, сыворотку, мокроту, амниотическую жидкость, цереброспинальную жидкость, клеточный лизат, асцитную жидкость, мочу, слюну и ткань.

Как используют в рамках изобретения, термин "приведение в контакт" относится к действию комбинирования, которое приводит антитело по изобретению в контакт с биологическим образцом так, чтобы происходило связывающее взаимодействие между антителом и белком-мишенью (например, профактор D или зрелый фактор D) в биологическом образце.

Как используют в рамках изобретения, термин "детектирующее антитело" или "антитело детекции" относится к антителам, которые могут быть обнаружены. Детектирующее антитело может быть прямо или непрямо (например, через другое антитело) конъюгировано с поддающейся детекции меткой, или сигналом, или с генерирующей сигнал частью. Сигнал может быть радиоактивным (например, радиоактивный йод, тритий, углерод, сера и т.п.), колориметрическим, флуоресцентным сигналом и т.п. Генерирующие сигнал части, которые действуют на генерирующие сигнал субстраты, включают, но не ограничиваются ими, пероксидазу хрена (HRP) [подходящие субстраты включают 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ); OPD; 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоновою кислоту, дисоль аммония]; щелочную фосфатазу [подходящие субстраты включают п-нитрофенилфосфат, соль динатрия]; и бета-галактозидазу [подходящие субстраты включают О-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид]. Сигнал может быть усилен с использованием системы сопряжения авидин-биотин. Поддающаяся детекции метка или генерирующая сигнал часть может быт

присоединена либо прямо и/либо непрямо к антителам против фактора D и их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению. Например, иммуноконъюгат может содержать антитело против фактора D, которое является меченым радиоактивным изотопом или может обладать ферментативной активностью, которая позволяет детекцию в иммуноанализе.

Как используют в рамках изобретения, термин "ингибирующее MASP-3 средство" относится к любому средству, которое связывается с MASP-3 и ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D, тем самым ингибируя альтернативный путь активации комплемента (APC), включая антитела против MASP-3 и их связывающие MASP-3 фрагменты, натуральные и синтетические пептиды, конкурентные субстраты, низкомолекулярные соединения и ингибиторы экспрессии. Иллюстративные ингибирующие MASP-3 антитела описаны в WO2018/026722, включенной настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-3 средство представляет собой ингибирующее MASP-3 антитело, такое как ингибирующее MASP-3 моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из 4D5, 10D12 и 13B1.

Как используют в рамках изобретения, аминокислотные остатки сокращенно обозначаются следующим образом: 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 наиболее широком смысле встречающиеся в природе аминокислоты могут быть разделены на группы на основе химических характеристик боковых цепей соответствующих аминокислот. Под "гидрофобной" аминокислотой подразумевают любую из Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. Под "гидрофильной" аминокислотой подразумевают любую из Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эти группы аминокислот могут быть далее подразделены следующим образом. Под "незаряженной гидрофильной" аминокислотой подразумевают любую из Ser, Thr, Asn или Gln. Под "кислой" аминокислотой подразумевают либо Glu, либо Asp. Под "основной" аминокислотой подразумевают любую из Lys, Arg или His.

Как используют в рамках изобретения термин "консервативная аминокислотная замена" иллюстрируется заменой среди аминокислот в пределах каждой из следующих групп: (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, (2) фенилаланин, тирозин и триптофан, (3) серин и треонин, (4) аспартат и глутамат, (5) глутамин и аспарагин, и (6) лизин, аргинин и гистидин.

Как используют в рамках изобретения, "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты (например, полинуклеотид), которая не интегрирована в геномную ДНК организма. Например, молекула ДНК, кодирующая фактор роста, которая отделена от геномной ДНК клетки, является

выделенной молекулой ДНК. Другим примером выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является химически синтезированная молекула нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, которая выделена из конкретного вида, является меньшей, чем полная молекула ДНК хромосомы из этого вида.

Как используют в рамках изобретения, "конструкция молекулы нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, либо одноцепочечную, либо двухцепочечную, которая модифицирована посредством вмешательства человека так, чтобы она содержала сегменты нуклеиновой кислоты, скомбинированные и расположенные рядом в порядке, не существующем в природе.

Как используют в рамках изобретения, "экспрессирующий вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ген, который экспрессируется в клетке-хозяине. Как правило, экспрессирующий вектор содержит промотор транскрипции, ген и терминатор транскрипции. Экспрессия гена обычно находится под контролем промотора, и такой ген называют "функционально связанным" с промотором. Аналогично, регуляторный элемент и основной промотор функционально связаны, если регуляторный элемент модулирует активность основного промотора.

Как используют в рамках изобретения, термины "приблизительно" или "примерно", относящиеся к числу, обычно подразумевают включение чисел, которые входят в диапазон 5% в любом направлении (больше или меньше) от числа, если нет иных указаний или если иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда число будет превышать 100% от возможной величины). Когда приводятся диапазоны, конечные числа диапазонов включены в диапазон, если нет иных указаний или если иное не очевидно из контекста.

Как используют в рамках изобретения форма единственного числа включает множественные аспекты, если контекст явно не определяет иное. Таким образом, например, указание на "клетку" включает единичную клетку, а также две или более клеток; указание на "средство" включает одно средство, а также два или более средств; указание на "антитело" включает множество таких антител и указание на "каркасную область" включает указание на одну или несколько каркасных областей и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Процентную идентичность (%) аминокислотных последовательностей определяют как процент аминокислот в последовательности-кандидате, которые являются идентичными аминокислотам в эталонной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, если это необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности последовательностей, может быть достигнуто различными способами, известными в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для проведения выравнивания, включая любые алгоритмы,

необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей, могут быть определены известными способами.

Каждый вариант осуществления в настоящем описании применим с необходимыми изменениями к любому другому варианту осуществления, если нет иных явных указаний.

Для рекомбинантных ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция) могут использоваться стандартные способы. Ферментативные реакции и способы очистки могут проводиться в соответствии с инструкциями изготовителя, или как обычно проводится в данной области, или как описано в настоящем описании. Эти и сходные способы и методики обычно могут проводиться в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области и как описано в различных общих и более конкретных источниках литературы, которые цитируются и обсуждаются на протяжении настоящего описания. См., например, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); или другие актуальные публикации Current Protocol и другие ссылки. Если не приводятся конкретные определения, номенклатура, используемая применительно к, и лабораторные методики и способы молекулярной биологии, аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, используемые в настоящем описании, представляют собой те, которые хорошо известны и часто используются в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной технологии, способов молекулярной биологии, способов микробиологии, химического синтеза, получения, составления и доставки фармацевтических препаратов, и лечения пациентов.

Предусматривается, что любой из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, может быть осуществлен применительно к любому способу, набору, реагенту или композиции по изобретению, и наоборот. Более того, композиции по изобретению могут использоваться для выполнения способов по изобретению.

II. Обзор

Как описано в примерах 1-3 настоящего описания, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против фактора D, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека (также упоминаемым как антитела, специфичные к зрелому фактору D) и не связываются с профактором D. Как описано в примерах 8-9, настоящее изобретение также относится к моноклональным антителам против фактора D, которые специфически связываются с профактором D (также упоминаемым как антитела, специфичные к профактору D) и не связываются со зрелым фактором D. Как описано в примерах 4-5 настоящего описания, настоящее изобретение также относится к моноклональным антителам против фактора D, которые связываются

как с профактором D, так и со зрелым фактором D. Как описано в примерах 6 и 7, моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, и моноклональные антитела, специфичные к профактору D, являются пригодными для детекции зрелой и/или про-формы фактора D в биологических образцах и также могут использоваться для определения статуса альтернативного пути комплемента (APC) у млекопитающего. Как дополнительно описано в примерах 10-12, моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, и/или антитела, специфичные к профактору D, также могут использоваться для определения статуса фактора D после лечения ингибирующим MASP-3 средством, таким как ингибирующее MASP-3 антитело, которое ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с N-концевой областью зрелого фактора D человека, и к применению этих антител в способах детекции наличия или количества зрелого фактора D в биологическом образце. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с активационным (про)пептидом профактора D, и к применению этих антител в способах детекции наличия или количества профактора D в биологическом образце. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению моноклональных антител, специфичных к зрелому фактору D, и/или к применению моноклональных антител, специфичных к профактору D, для определения наличия или количества зрелого фактора D и/или профактора D у млекопитающего до и после лечения ингибирующим MASP-3 средством, таким как высокоаффинное ингибирующее MASP-3 антитело, где ингибирующее MASP-3 антитело способно ингибировать конвертирование профактора D в зрелый фактор D и тем самым ингибировать APC.

Таким образом, рассматриваемые антитела могут использоваться в диагностических способах для детекции наличия или количества зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума. В одном варианте осуществления наличие или количество зрелого фактора D и/или профактора D является пригодным в качестве биомаркера для определения эффективности ингибирующего MASP-3 средства для ингибирования APC и/или мониторинга дозирования у индивидуума, которому проводят лечение ингибирующим MASP-3 средством, таким как ингибирующее MASP-3 антитело (например, ингибирующие MASP-3 антитела 4D5, 10D12 или 13B1), у индивидуума.

III. Обзор системы комплемента

На фиг.1 проиллюстрированы три пути, которые запускают активность комплемента в ответ на разные иницирующие события: классический, лектиновый и альтернативный (Noris M., *Semin Nephrol* 33(6):479-92, 2013). Классический путь запускается иммунными комплексами и опосредует важные иммуноэффektorные функции через раннюю активность двух протеаз, C1r и C1s. Лектиновый путь может

активироваться конкретными типами углеводных паттернов на клеточной поверхности, которые обычно присутствуют на микроорганизмах или поврежденной ткани хозяина, но не на здоровых клеточных поверхностях хозяина. Активация лектинового пути инициируется группой ферментов, известных как маннан-связывающая лектин-ассоциированная сериновая протеаза-1 и 2 (MASP-1 и MASP-2) (Yongqing T. et al., *Biochim Biophys Acta* 1824(1):253-62, 2012). Эти протеазы образуют комплексы с лектинами, такими как маннан-связывающий лектин (MBL), фиколинами и коллектинами 10 и 11. Лектины связывают углеводные паттерны на чужеродных или поврежденных клетках хозяина, таким образом, нацеливая протеолитическую активность MASP на конкретные поверхности. Фактор D комплемента (CFD) представляет собой сериновую протеазу, которая необходима для активации альтернативного пути. Как показано на фиг.1, фактор D (CFD) экспрессируется в качестве неактивного профермента (обозначаемого в настоящем описании как "профактор D), и он циркулирует в плазме преимущественно в качестве расщепленной зрелой сериновой протеазы (упоминаемой в настоящем описании как "зрелый фактор D"). Как описано в WO2013/180834 и WO2013/192240, недавно было определено, что MASP-3 является ответственной за конвертирование фактора D комплемента (CFD) из проферментной формы белка (профактор D) в зрелую форму (зрелый фактор D), что, таким образом, делает белок MASP-3 ключевой вышестоящей регуляторной стадией для альтернативного пути. Как дополнительно описано в WO2018/026722, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, были получены многочисленные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела, которые связывают домен сериновой протеазы в MASP-3 и ингибируют его каталитическую активность, тем самым ингибируя конвертирование профактора D в зрелый фактор D и блокируя активацию альтернативного пути.

Основной функцией системы комплемента - части врожденного иммунного ответа - является защита организма-хозяина от инфекционных агентов (Ricklin et al., *Nat Immunol* 11(9):785-97, 2010). Посредством скоординированного действия ансамбля белковых комплексов и протеолитических каскадов эта сложная физиологическая система нацеливает иммунные и воспалительные ответы на поверхности, которые экспонируют молекулярные паттерны, обычно не присутствующие на здоровых клетках-хозяевах. Активация системы комплемента завершается направленным разрушением клеток путем образования мембраноатакующего комплекса (MAC), который прямо разрушает мембраны патогена, вызывая клеточный лизис, или путем опсонизации, которая способствует поглощению инфекционного агента фагоцитарными клетками, как показано на фиг.1. Кроме того, расщепление субстрата протеазами комплемента высвобождает цитокин-подобные пептиды, называемые анафилатоксинами, которые запускают некоторые важные виды биологической активности, такие как привлечение лейкоцитов и активация иммунных клеток.

Альтернативный путь комплемента (APC) обычно описывается как нижестоящий усилитель активности комплемента, усиливающий иммунный ответ хозяина после

активации комплемента посредством классического и лектинового путей. Однако способность APC создавать петлю положительной обратной связи из протеазных комплексов с активностью, которая запускает образование новых комплексов того же типа, является уникальной в каскадах комплемента (Lachmann et al., *Adv Immunol* 104:115-49, 2009). Самораспространяющийся комплекс, C3-конвертаза APC, состоит из 2 белков: C3b и Bb. Вновь образованный C3b может ковалентно связываться с локальными поверхностями через сложную тиоэфирную связь и функционировать в качестве мощного опсонина, направляющего маркированные клетки на поглощение и разрушение. Кроме того, C3b обеспечивает каркас для связывания и активации фактора В комплемента (CFB) (Lachmann et al., *Adv Immunol* 104:115-49, 2009; Noris et al., *Semin Nephrol* 33(6):479-92, 2013). В комплексе с C3b CFB принимает соответствующую конфигурацию для расщепления фактором D комплемента (CFD). Это событие расщепления конвертирует одноцепочечный полипептид в некаталитический (Ba) и каталитический (Bb) фрагменты. Фрагмент Ba высвобождается из комплекса; а фрагмент Bb остается ассоциированным с C3b, образуя активную C3-конвертазу APC - C3bBb, Lachmann et al., *Adv Immunol* 104:115-49, 2009; Noris et al., *Semin Nephrol* 33(6):479-92, 2013). Именно способность C3bBb расщеплять дополнительный C3 и продуцировать множество новых конвертаз обеспечивает механизм лавинообразного усиления сигнала.

В то время как система комплемента содействует иммунитету организма против патогенов, нарушение регуляции и незатихающая активность комплемента также могут служить в качестве основного пускового фактора аутоиммунных заболеваний, вызывая неконтролируемое развитие воспаления и разрушение тканей. Во многих контекстах APC и петля усиления C3b играют важную роль в определении степени ответа комплемента и его дальнейших последствий. Таким образом, терапевтическое модулирование APC посредством ингибирования активности Bb или блокирования активации CFB посредством расщепления CFD являются хорошо охарактеризованными потенциальными точками контроля для лечения многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний, опосредуемых APC.

Как отмечалось выше, было продемонстрировано, что MASP-3 ответственна за конвертирование CFD из проферментной формы белка в зрелую форму, что, таким образом, делает белок MASP-3 ключевой вышестоящей регуляторной стадией альтернативного пути. У животных дикого типа или в плазме человека значительное большинство системного CFD уже процессировано в зрелую форму вследствие активности MASP-3 *in vivo*, что делает оценку *in vitro* ингибирования APC ингибиторами MASP-3 с использованием традиционных способов анализа невозможной. Таким образом, существует необходимость в реагентах для детекции и способах анализа для определения наличия или количества профактора D и/или зрелого фактора D в биологическом образце, которые могут использоваться в качестве биомаркеров статуса APC и также могут использоваться для оценки *in vitro* и/или *in vivo* ингибирования APC ингибиторами MASP-3.

IV. Антитела против фактора D

Как описано выше, фактор D комплемента (CFD) представляет собой сериновую протеазу, которая необходима для активации APC. Как показано на фиг.1, фактор D (CFD) экспрессируется в качестве неактивного профермента (упоминаемого в настоящем описании как "профактор D"), и он циркулирует в плазме преимущественно в качестве расщепленной зрелой сериновой протеазы (упоминаемого в настоящем описании как "зрелый фактор D").

На фиг.2 приведены аминокислотные последовательности (i) полноразмерного фактора D человека (SEQ ID NO:1), включая сигнальную последовательность а.к. 1-19 (указанную курсивом) с подчеркнутым активационным (про)пептидом; (ii) профактора D человека (SEQ ID NO:2), с подчеркнутым пропептидом; и (iii) зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3). Как показано на фиг.2, пропептид профактора D человека представляет собой "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

На фиг.3 приводится выравнивание аминокислотных последовательностей фактора D комплемента (полноразмерного) из разных видов, включая *Homo sapiens* (SEQ ID NO:1); *Macaca* (SEQ ID NO:8); *Canis* (SEQ ID NO:9); *Rattus* (SEQ ID NO:10) и *Mus musculus* (SEQ ID NO:11). Выделенная курсивом часть каждой последовательности обозначает сигнальную последовательность и подчеркнутая часть обозначает последовательность активационного "про"-пептида.

Как показано на фиг.2 и 3, белок фактора D содержит N-концевую про-область, область активационного пептида и остальную C-концевую область. Зрелый фактор D имеет уникальный N-конец по сравнению с профактором D в каждом виде (например, N-конец, начинающийся с остатка 26 полноразмерного фактора D человека (SEQ ID NO:1)). Зрелый фактор D и профактор D имеют общую последовательность на C-концевой части соответствующих белков (например, в аминокислотах с 27 по 253 SEQ ID NO:1).

A. Моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D человека

Как описано в примерах 1 и 2 настоящего изобретения, авторы изобретения использовали пептид "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), соответствующий аминокислотным остаткам 1-7 N-концевой области зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), в качестве антигена для получения антител, специфичных к зрелому фактору D, пригодных для применения в анализах и способах детекции, описанных в настоящем описании. Как показано на фиг.3, N-концевая последовательность "ILGGREA" (SEQ ID NO:5) является консервативной между белками зрелого фактора D человека (*homo sapiens*) и макака (*macaca*).

Как описано в примере 2, были клонированы и отсекуены варибельные фрагменты тяжелых и легких цепей нескольких репрезентативных моноклональных антител, специфичных к зрелому фактору D.

На фиг.7A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелых цепей шести клонов, специфичных к зрелому фактору D, которые были идентифицированы как имеющие высокую аффинность связывания с N-

концевым пептидом "ILGGREA" (SEQ ID NO:5) зрелого фактора D.

На фиг.7В представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей легких цепей шести клонов, специфичных к зрелому фактору D, которые были идентифицированы как имеющие высокую аффинность связывания с N-концевым пептидом "ILGGREA", SEQ ID NO:5, зрелого фактора D.

Переменные области тяжелых цепей и легких цепей и их CDR из шести антител, специфичных к зрелому фактору D, приведены ниже в таблицах 1 и 2.

ТАБЛИЦА 1: Последовательности антител, специфичных к зрелому фактору D человека: мышинные родительские

Ссылочный № антитела против активного фактора D человека	Переменная область тяжелой цепи (аминокислотная)	Переменная область легкой цепи (аминокислотная)	Переменная область тяжелой цепи (ДНК)	Переменная область легкой цепи (ДНК)
6G6	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:79
14A11	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:80
27B3	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:81
58F5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:82
49G3	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:83
10G1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:84

ТАБЛИЦА 2: Антитела, специфичные к зрелому фактору D человека: CDR

Ссылочный № антитела против активного фактора D человека	Тяжелая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Легкая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Тяжелая цепь, консенсусная: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Легкая цепь, консенсусная: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
6G6	25;27;29	50;52;54	65;66;67	68;69;54
14A11	25;27;29	50;52;54	65;66;67	68;69;54
27B3	33,34,36	58,52,54	65;66;67	68;69;54
58F5	38,39,41	60,52,54	65;66;67	68;69;54
49G3	43,39,41	62,52,54	65;66;67	68;69;54
10G1	43,39,47	63,64,54	65;66;67	68;69;54

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с

эпитопом на аминоконцевой (N-концевой) области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислотной последовательности "ILGGREA" (SEQ ID NO:5). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент специфически связывается со зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3) и не связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, представляет собой гуманизованное, химерное или полностью человеческое антитело. В одном варианте осуществления фрагмент антитела, специфичного к зрелому фактору D, выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, представляет собой одноцепочечную молекулу. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент связывается со зрелым фактором D человека с K_D менее 10 нМ. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью, например, поддающейся детекции частью, подходящей для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано ниже. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент иммобилизованы на подложке, такой как подложка, подходящая для применения в иммуноанализе, как описано в настоящем описании далее.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент (т.е. антитело или его фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека) содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность X₁SX₂MGV₃S (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность H₁I₂Y₃W₄D₅E₆K₇H₈Y₉X₁₀P₁₁S₁₂L₁₃K₁₄X₁₅ (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность R₁Y₂Y₃G₄Y₅X₆X₇X₈M₉X₁₀Y₁₁ (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет

собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где: X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где: X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:12, и VL, содержащий SEQ ID NO:18. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:13, и VL, содержащий SEQ ID NO:19.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:33, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:34; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 36; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:58, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20. В одном

варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:14, и VL, содержащий SEQ ID NO:20.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:38, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:60, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:15, и VL, содержащий SEQ ID NO:21.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:62, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:16, и VL, содержащий SEQ ID NO:22.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 47; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:63, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:64, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека,

или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:17, и VL, содержащий SEQ ID NO:23.

В определенных вариантах осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, имеют переменный домен тяжелой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен) любой из последовательностей переменного домена тяжелой цепи, приведенных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, имеют переменный домен легкой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен) любой из последовательностей переменного домена легкой цепи, приведенных в таблице 1.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой цепи антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:12-17, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена легкой цепи антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, где переменная область

легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:18-23, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 12-17, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 12-17, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, специфичного к зрелому фактору D человека, включающему культивирование клетки, содержащей экспрессирующий вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или оба из полипептидов тяжелой и легкой цепей любого из антител, специфичных к зрелому фактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании. Клетку или культуру клеток культивируют в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии клеткой (или культурой клеток) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Способ также может включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или культуры клеток) или из среды, в которой клетку или клетки культивировали.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей любое из антител, специфичных к зрелому фактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к подложке для применения в иммуноанализе, содержащей по меньшей мере одно или несколько из любых антител, специфичных к зрелому фактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору для детекции наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, таком как

биологический образец, причем указанный набор содержит (а) по меньшей мере один контейнер и (b) по меньшей мере одно или несколько из любых антител, специфичных к зрелому фактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

В. Моноклональные антитела, специфичные к профактору D человека

Как описано в примерах 8 и 9 настоящего описания, авторы изобретения использовали пропептид человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4), соответствующий остаткам 20-25 полноразмерного фактора D человека, в качестве антигена для получения антител, специфичных к профактору D, подходящих для применения в анализах и способах детекции, описанных в настоящем описании.

Как описано в примере 9, были клонированы и отсекуены фрагменты переменных областей тяжелых и легких цепей нескольких репрезентативных моноклональных антител, специфичных к профактору D.

На фиг.16A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых цепей шести клонов, направленных против профактора D, которые были идентифицированы в качестве имеющих высокую аффинность связывания с пропептидом фактора D человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

На фиг.16B представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей легких цепей шести клонов, направленных против профактора D, которые были идентифицированы в качестве имеющих высокую аффинность связывания с пропептидом фактора D человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

Переменные области тяжелых цепей и легких цепей и их CDR из шести моноклональных антител, специфичных к профактору D, приведены ниже в таблицах 3 и 4.

ТАБЛИЦА 3: последовательности антител, специфичных к профактору D человека: мышинные родительские

Ссылочный № антитела против профактора D человека	Переменная область тяжелой цепи (аминокислотная)	Переменная область легкой цепи (аминокислотная)	Переменная область тяжелой цепи (ДНК)	Переменная область легкой цепи (ДНК)
18F5	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:212
1F9	SEQ ID NO:137	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:207	SEQ ID NO:213
2A4	SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:208	SEQ ID NO:214
20A1	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:209	SEQ ID NO:215

	NO:139			
13A10	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:210	SEQ ID NO:216
21H1	SEQ ID NO:141	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:211	SEQ ID NO:217

ТАБЛИЦА 4: антитела, специфичные к профактору D человека: CDR

Ссылочный № антитела против профактора D человека	Тяжелая цепь:	Легкая цепь:	Тяжелая цепь, консенсусная:	Легкая цепь, консенсусная:
	CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
18F5	149, 151, 153	176, 178, 180	201, 202, 203	204, 178, 205
1F9	155, 156, 153	176, 178, 180	201, 202, 203	204, 178, 205
2A4	158, 159, 161	184, 178, 187	201, 202, 203	204, 178, 205
20A1	158, 163, 165	189, 178, 187	201, 202, 203	204, 178, 205
13A10	167, 169, 171	194, 196, 198	167, 169, 171	194, 196, 198
21H1	167, 173, 174	194, 199, 200	167, 173, 174	194, 199, 200

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится выделенному антителу или его фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом в активационном ("про") пептиде фактора D человека, указанном под "APPRGR" (SEQ ID NO:4), где антитело или фрагмент специфически связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2) и не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело. В одном варианте осуществления фрагмент антитела, специфичного к профактору D, выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, представляет собой одноцепочечную молекулу. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с профактором D человека с K_D менее 10 нМ. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью, например, поддающейся детекции частью, пригодной для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем описании. В

одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент иммобилизованы на подложке, такой как подложка, пригодная для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент (т.е. антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека) содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XYWMS (SEQ ID NO:201), где X в положении 1 представляет собой N, S или T; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность EIRLKSXNYAXXYXESVKG (SEQ ID NO:202), где X в положении 7 представляет собой D или E, X в положении 11 представляет собой T или A, X в положении 12 представляет собой H или Y и X в положении 14 представляет собой A или T; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность AWFAX (SEQ ID NO:203), где X в положении 5 представляет собой S, Y или N; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSSQXLLYSXDQKNYLA (SEQ ID NO:204), где X в положении 1 представляет собой M или K, X в положении 5 представляет собой S или N, и X в положении 10 представляет собой K или R; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO:178); и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность LQYYXYPYT (SEQ ID NO:205), где X в положении 5 представляет собой T или S. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:149 или SEQ ID NO:155, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:151 или SEQ ID NO:156; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:153; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:176, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:180. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по

меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:136. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:137. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:142. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:143. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:136, и VL, содержащий SEQ ID NO:142. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:137, и VL, содержащий SEQ ID NO:143.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:158, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:159 или SEQ ID NO:163; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:161 или SEQ ID NO:165; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:184 или SEQ ID NO:189, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:187. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:138. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:139. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:144. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:145. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:138, и VL, содержащий SEQ ID NO:144. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:139, и VL, содержащий SEQ ID NO:145.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID NO:200. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:140. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:141. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:146. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:147. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:140, и VL, содержащий SEQ ID NO:146. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:141, и VL, содержащий SEQ ID NO:147.

В определенных вариантах осуществления антитело, специфичное к профактору D,

или его фрагмент имеет переменный домен тяжелой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен) любой из последовательностей переменного домена тяжелой цепи, приведенных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления антитела, специфичного к профактору D, или его фрагмент имеет переменный домен легкой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен) любой из последовательностей переменного домена легкой цепи, приведенных в таблице 3.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой цепи антитела, специфичного к профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:136-141, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена легкой цепи антитела, специфичного к профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:142-147, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:136-141, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую

кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела, специфичного к профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 136-141, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, специфичного к профактору D человека, включающему культивирование клетки, содержащей экспрессирующий вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или оба из полипептидов тяжелой и легкой цепей любого из антител, специфичных к профактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании. Клетку или культуру клеток культивируют в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии клеткой (или культурой клеток) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Способ также может включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или культуры клеток) или из среды, в которой клетку или клетки культивировали.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей любое из антител, специфичных к профактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к подложке для применения в иммуноанализе, содержащей по меньшей мере одно или несколько из любых антител, специфичных к профактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору для детекции наличия или количества профактора D в тестируемом образце, таком как биологический образец, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер и (b) по меньшей мере одно или несколько из любых антител, специфичных к профактору D, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании.

С. Моноклональные антитела против фактора D человека, которые связываются как с про-формой, так и со зрелой формой фактора D

Как описано в примерах 4-5 настоящего описания, настоящее изобретение также относится к антителам против фактора D, которые связываются с эпитопом, который присутствует как в профакторе B человека, так и в зрелом факторе D человека. Как описано в примере 4, авторы изобретения использовали зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) в качестве антигена для получения антител против фактора D, которые были подвергнуты скринингу и селекции в отношении способности к детекции как про-форму, так и зрелую форму, фактора D и которые пригодны для применения в комбинации с

антителами, специфичными к зрелому фактору D, и антителами, специфичными к профактору D, описанными в настоящем описании, в анализах и способах детекции, описанных в настоящем описании.

Как описано в примере 5, были клонированы и отсекувенированы переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей нескольких репрезентативных моноклональных антител против фактора D, которые связываются как с профактором D, так и со зрелым фактором D.

На фиг.10А представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых цепей пяти клонов фактора D, которые были идентифицированы в качестве обладающих высокой аффинностью связывания как со зрелым фактором D, так и с профактором.

На фиг.10В представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи пяти клонов, направленных против фактора D, которые были идентифицированы в качестве имеющих высокую аффинность связывания как со зрелым фактором D, так и с профактором D.

Переменные области тяжелой цепи и легкой цепи и их CDR из пяти моноклональных антител против фактора D, которые связываются как со зрелым фактором D, так и с профактором D, приведены ниже в таблицах 5 и 6.

ТАБЛИЦА 5: Последовательности антител против фактора D человека: мышинные родительские

Ссылочный № антитела против фактора D человека	Переменная область тяжелой цепи (аминокислотная)	Переменная область легкой цепи (аминокислотная)	Переменная область тяжелой цепи (ДНК)	Переменная область легкой цепи (ДНК)
3C5	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:127	SEQ ID NO:131
30H2	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:127	SEQ ID NO:132
11H1	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:133
12H10	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:129	SEQ ID NO:134
7H2	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:130	SEQ ID NO:135

ТАБЛИЦА 6: Антитела против фактора D человека: CDR

Ссылочный № антитела против фактора D человека	Тяжелая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Легкая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
3C5	95; 97; 99	111; 113; 115
30H2	95; 97; 99	111; 113; 115
11H1	101; 103; 105	60; 119; 121
12H10	101; 107; 108	123; 124; 125
7H2	101; 107; 105	60; 126; 121

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом, присутствующим как в профакторе D человека (SEQ ID NO:2), так и в зрелом факторе D человека (SEQ ID NO:3), где антитело содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D, которое связывается с эпитопом, присутствующим как в профакторе D, так и в зрелом факторе D, представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления антитело против фактора D представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело. В одном варианте осуществления фрагмент антитела против фактора D выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂. В одном варианте осуществления антитело против фактора D представляет собой одноцепочечную молекулу. В одном варианте осуществления антитело против фактора D представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D человека, с K_D менее 10 нМ. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом, присутствующим как в профакторе D, так и в зрелом факторе D, является меченным поддающейся детекции частью, например, поддающейся детекции частью, пригодной для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, присутствующим как в профакторе D, так и в зрелом факторе D, являются иммобилизованными на подложке, такой как подложка, подходящая для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95 (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99 (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103 или 107, (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105 или 108, (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60 или 123; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119, 124 или 126, и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:121 или 125.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:85. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:89. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:90. В одном варианте осуществления антитело против

фактора D или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:85, и VL, содержащий SEQ ID NO:89. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:85, и VL, содержащий SEQ ID NO:90.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:86. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:87. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:88.

В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, содержат VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:91. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:92. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (такой как идентичность меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:93. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:86, и VL, содержащий SEQ ID NO:91. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит VH, содержащий SEQ ID NO:87, и VL, содержащий SEQ ID NO:92. В одном варианте осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержат VH, содержащий SEQ ID NO:88, и VL, содержащий SEQ ID NO:93.

В определенных вариантах осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D, имеют переменный домен тяжелой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%,

по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен) любой из последовательностей вариабельного домена тяжелой цепи, приведенных в таблице 5.

В определенных вариантах осуществления антитело против фактора D или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D, имеют вариабельный домен легкой цепи, который по существу идентичен (например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен, или по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен, или по меньшей мере на 99% идентичен), любой из последовательностей вариабельного домена, приведенных в таблице 5.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи антитела против фактора D или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:85-88, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:89-93, и где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи антитела против фактора B или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:85-88, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела против фактора D или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:85-88, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO:89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, которое связывается с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, включающему культивирование клетки, содержащей экспрессирующий вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или оба из полипептидов тяжелой и легкой цепей любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании. Клетку или культуру клеток культивируют в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии клеткой (или культурой клеток) антитела против фактора D или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Способ также может включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или культуры клеток) или из среды, в которой клетку или клетки культивировали.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей любое из антител против фактора D, или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, которые описаны в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к подложке для применения в иммуноанализе, содержащей по меньшей мере одно или несколько из антител против фактора D, или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, которые описаны в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору для детекции наличия или количества профактора D в тестируемом образце, таком как биологический образец, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер и (b) по меньшей мере одно или несколько из любых антител против фактора D, или антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, которые описаны в настоящем описании.

Одноцепочечные антитела против фактора D

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела против фактора D (т.е. любые из антител, специфичных к зрелому фактору D, антител,

специфичных к профактору D или антител против фактора D, которые связываются как со зрелой формой, так и с про-формой фактора D) представляют собой одноцепочечные антитела, определяемые как сконструированная способами генной инженерии молекула, содержащая переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, связанные подходящим полипептидным линкером, в качестве генетически слитой одноцепочечной молекулы. Такие одноцепочечные антитела также упоминаются как фрагменты антител "одноцепочечный Fv" или "scFv". Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Антитела scFv, которые связывают фактор D, могут быть ориентированы так, чтобы переменная область легкой цепи находилась либо со стороны N-конца от переменной области тяжелой цепи, либо с C-конца от нее.

Гуманизированные антитела против фактора D

Антитела против фактора D, описанные в настоящем описании (т.е. любые из антител, специфичных к зрелому фактору D, антител, специфичных к профактору D, или антител против фактора D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D), могут быть модифицированы без изменения возможности применять их для целей, описанных в настоящем описании. Прежде всего, следует отметить, что антитела, описанные в настоящем описании, получены из иммунизированных мышей. Таким образом, антитела имеют каркасные области (области вне определяющих комплементарность областей, или "CDR"), которые содержат аминокислотные остатки, обычно встречающиеся в каркасных областях антител мыши, и которые могут быть иммуногенными при введении пациенту-человеку. Для снижения иммуногенности антител мыши при применении у человека в данной области часто модифицируют каркасные области путем замены остатков, встречающихся в конкретных положениях антител мышей, на остатки более часто встречающиеся в том же положении антител человека. Антитела, модифицированные таким образом, называют "гуманизированными антителами" и они, как правило, являются предпочтительными для применения *in vivo*, поскольку они имеют более низкий риск индукции побочных эффектов и, как правило, могут дольше оставаться в кровотоке. Способы гуманизации антител известны в данной области и подробно описаны, например, в патентах США № 6180377; 6407213; 5693762; 5585089 и 5530101.

Кроме того, поскольку CDR переменных областей определяют специфичность антитела, CDR антитела против фактора D, приведенные в таблицах 2, 4, 6-10 и 12-17, могут быть трансплантированы или встроены способами инженерии в выбранное антитело для сообщения этому антителу специфичности связывания фактора D. Например, CDR из специфичных к зрелому фактору D клонов 6G6, 14A11, 27B3, 58F5, 49G3 и 10G1, как указано в таблице 2, и/или из специфичных к профактору D клонов 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, как указано в таблице 4, могут быть трансплантированы в каркасную область антитела человека с известной трехмерной

структурой (см., например, WO98/45322; Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) и Winter & Milstein, Nature 349:293 (1991) для получения антитела, специфичного к зрелому фактору D, или антитела, специфичного к профактору D, со сниженным иммуногенным ответом или его отсутствием при введении человеку.

Способы получения антител против фактора D

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антитела, специфически распознающего и связывающего фактор D человека, такого как антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, или антитела против фактора D, которые связываются как со зрелой формой, так и с про-формой фактора D, включающему культивирование клетки, содержащей экспрессирующий вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или оба из полипептидов легкой и тяжелой цепей любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании. Клетку или культуру клеток культивируют в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии клеткой (или культурой клеток) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Также способ может включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или культуры клеток) или из среды, в которой клетка или клетки культивировались.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 12-17, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 18-23.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 136-141, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 142-147.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против фактора D или его фрагмент по изобретению, такие как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека (например, как указано в таблице 1), антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически

связываются с профактором D человека (например, как указано в таблице 3), или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека (например, как указано в таблице 5). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против фактора D, например, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека (например, SEQ ID NO: 73-84), или кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека (например, SEQ ID NO: 206-217), или кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека (например, SEQ ID NO: 127-135).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую моноклональное антитело, специфичное к фактору D, по изобретению (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессирующей кассете, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую моноклональное антитело, специфичное к фактору D по изобретению (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения моноклональных антител, специфичных к фактору D, включающему культивирование клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, специфичное к фактору D, по изобретению (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D).

Во многих вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие рассматриваемое моноклональное антитело, вводят непосредственно в клетку-хозяина и клетку инкубируют в условиях, достаточных для индукции экспрессии кодируемого антитела.

В одном варианте осуществления способ получения моноклонального антитела, специфичного к фактору D (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, или антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D), включает культивирование клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, специфичное к фактору D, по изобретению.

В соответствии с определенными родственными вариантами осуществления предусматривается рекомбинантная клетка-хозяин, которая содержит одну или несколько

конструкций, как описано в настоящем описании; нуклеиновая кислота, кодирующая любое антитело против фактора D, CDR, VH- или VL-домен, или их антигенсвязывающий фрагмент; и способ получения кодируемого продукта, который включает экспрессию с кодирующей нуклеиновой кислоты. Экспрессии можно удобным образом достигать путем культивирования в соответствующих условиях рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту. После продуцирования посредством экспрессии антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выделены и/или очищены с использованием любого подходящего способа, а затем использованы желаемым образом.

Например, в качестве клетки-хозяина можно использовать любую клетку, пригодную для экспрессии экспрессирующих кассет, например, клетки дрожжей, насекомых, растений и т.д. Во многих вариантах осуществления используют линию клеток-хозяев млекопитающих, которая обычно не продуцирует антитела, примеры которых являются следующими: клетки почки обезьяны (клетки COS), клетки CVI почки обезьяны, трансформированные SV40 (COS-7, ATCC CRL 165 1); клетки почки эмбриона человека (HEK-293, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CVI ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL 51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)); клетки NIH/3T3 (ATCC CRL-1658); и клетки L мыши (ATCC CCL-1). Дополнительные клеточные линии станут понятными специалистам в данной области. Широкое множество клеточных линий доступно в American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

Способы введения нуклеиновых кислот в клетки хорошо известны в данной области. Подходящие способы включают электропорацию, технологию генной пушки, преципитацию с фосфатом кальция, прямую микроинъекцию и т.п. Выбор способа, главным образом, зависит от типа трансформируемой клетки и обстоятельств, в которых трансформация происходит (т.е. *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). Общее обсуждение этих способов может быть найдено в Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3d ed., Wiley & Sons, 1995. В некоторых вариантах осуществления используют технологии опосредуемого липофектаминоом и кальцием переноса генов.

После введения рассматриваемых нуклеиновых кислот в клетку ее, как правило, инкубируют, обычно при 37°C, иногда в условиях селекции, в течение подходящего периода времени для обеспечения экспрессии антитела. В большинстве вариантов осуществления антитело обычно секретируется в супернатант среды, в которой выращивают клетку.

В клетках-хозяевах млекопитающих для экспрессии рассматриваемого антитела можно использовать ряд экспрессирующих систем на основе вирусов. В случаях, когда в качестве экспрессирующего вектора используют аденовирус, представляющая интерес кодирующая антитело последовательность может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, последовательностью позднего промотора и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген можно встраивать в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Встраивание в не являющуюся необходимой область вирусного генома (например, область E1 или E3) приводит к рекомбинантному вирусу, который является жизнеспособным и способным экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах. (Например, см. Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). Эффективность экспрессии может быть усилена путем включения соответствующих энхансерных транскрипционных элементов, терминаторов транскрипции и т.д. (см. Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Для длительного продуцирования рекомбинантных антител с высоким выходом можно использовать стабильную экспрессию. Например, можно конструировать клеточные линии, которые экспрессируют молекулу антитела. Вместо использования экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные ориджины репликации, клетки-хозяева можно трансформировать экспрессирующими иммуноглобулин кассетами и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК, модифицированным клеткам можно позволять расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде, а затем переключать на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде обеспечивает резистентность при селекции и позволяет клеткам стабильно встраивать плазмиду в хромосому и расти с образованием очагов, которые в свою очередь могут быть клонированы и увеличены в количестве с получением клеточных линий. Такие модифицированные клеточные линии могут быть особенно пригодными при скрининге и оценке соединений, которые прямо или непрямо взаимодействуют с молекулой антитела.

После продуцирования молекулы по изобретению ее можно очищать любым способом очистки молекулы иммуноглобулина, известным в данной области, например, хроматографией (например, ионообменная, аффинная, в частности, по аффинности в отношении специфического антигена после белка А, и хроматография на сортирующей по размеру колонке), центрифугированием, способом дифференциальной растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков. Во многих вариантах осуществления антитела секретируются из клетки в культуральную среду, и их собирают из культуральной среды. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, может быть включена рядом с кодирующей областью антитела или фрагмента. Такой сигнальный пептид может быть включен рядом с 5'-коцом аминокислотных последовательностей, указанных в настоящем описании для рассматриваемых антител, для облегчения продуцирования рассматриваемых антител.

Антитела против фактора D, меченные поддающейся детекции частью

В другом аспекте изобретение относится к антителам против фактора D (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D), которые мечены поддающейся детекции частью (т.е. часть, которая позволяет детекцию и/или количественное определение). В различных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, конъюгированы с поддающейся детекции меткой, которая может быть обнаружена прямо или непрямо. В этом отношении "конъюгат" антитела относится к антителу против фактора D, которое ковалентно связано с поддающейся детекции меткой. В рамках настоящего изобретения моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и производные антител, такие как антитело в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента или антитело с эпитопной меткой, могут быть ковалентно связаны с поддающейся детекции меткой. При "прямой детекции" используется только одно поддающееся детекции антитело, т.е. первичное поддающееся детекции антитело. Таким образом, прямая детекция означает, что антитело, которое конъюгировано с поддающейся детекции меткой, может быть обнаружено само по себе без необходимости в добавлении второго антитела (вторичное антитело).

"Поддающаяся детекции метка" представляет собой молекулу или материал, которые могут генерировать поддающийся детекции (например, визуально, электронными методами или иным образом) сигнал, который указывает на присутствие и/или концентрацию метки в образце. Конъюгированная с антителом поддающаяся детекции метка может использоваться для определения локализации и/или количественного определения мишени, в отношении которой антитело является специфическим. Таким образом, присутствие и/или концентрация мишени в образце могут быть обнаружены путем детекции сигнала, сгенерированного поддающейся детекции меткой. Детекцию поддающейся детекции метки можно проводить прямо или непрямо, и можно использовать несколько поддающихся детекции меток, конъюгированных с разными специфическими антителами, в комбинации для детекции одной или нескольких мишеней.

Примеры поддающихся детекции меток, которые могут быть обнаружены прямо, включают флуоресцентные красители, и радиоактивные вещества, и металлические частицы. Напротив, непрямая детекция требует применения одного или нескольких дополнительных антител, т.е. вторичных антител, после применения первичного антитела. Таким образом, детекцию проводят путем детекции связывания вторичного антитела или связывающего агента с первичным поддающимся детекции антителом. Примеры первичных поддающихся детекции связывающих агентов или антител, требующих добавления вторичного связывающего агента или антитела, включают ферментативные поддающиеся детекции связывающие агенты и гаптеновые поддающиеся детекции связывающие агенты или антитела.

Примеры поддающихся детекции меток, которые могут быть конъюгированы с антителами по настоящему изобретению, включают флуоресцентные метки, ферментные

метки, радиоизотопы, хемилюминесцентные метки, электрохемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки, полимеры, полимерные частицы, металлические частицы, гаптены и красители.

Примеры флуоресцентных меток включают 5-(и 6)-карбоксифлуоресцеин, 5- или 6-карбоксифлуоресцеин, 6-(флуоресцеин)-5-(и 6)-карбоксамидогексановую кислоту, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, тетраметилродамин и красители, такие как $Cy2$, $Cy3$, и $Cy5$, необязательно замещенные кумарином, включая AMCA, PerCP, фикобилипротеины, включая R-фикоэритрин (RPE) и аллофикоэритрин (APC), тexasский красный, принстонский красный, зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его аналоги, и конъюгаты R-фикоэритрина или аллофикоэритрина, неорганические флуоресцентные метки, такие как частицы на основе полупроводникового материала, такие как покрытые нанокристаллиты CdSe.

Примеры меток на основе полимерных частиц включают микрочастицы или латексные частицы полистирола, PMMA или диоксида кремния, в которые могут быть заключены флуоресцентные красители, или полимерные мицеллы или капсулы, которые содержат красители, ферменты или субстраты.

Примеры меток на основе металлических частиц включают золотые частицы или покрытые золотые частицы, которые могут быть преобразованы серебряными красителями. Примеры гаптенных меток включают DNP, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), биотин и дигоксигенин. Примеры ферментных меток включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (ALP или AP), β -галактозидазу (GAL), глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, β -N-ацетилглюкозаминидазу, β -глюкуронидазу, инвертазу, ксантиноксидазу, люциферазу светлячка и глюкозооксидазу (GO). Примеры часто используемых субстратов для пероксидазы хрена включают 3,3'-диаминобензидин (DAB), усиленный никелем диаминобензидин, 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), бензидин дигидрохлорид (BDHC), реагент Ханкера-Яте (HYR), индофан синий (IB), тетраметилбензидин (TMB), 4-хлор-1-нафтол (CN), альфа-нафтол пиронин (альфа-NP), одианизидин (OD), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), нитро синий тетразолий (NBT), 2-(п-йодфенил)-3-п-нитрофенил-5-фенилтетразолий хлорид (INT), тетранитро синий тетразолий (TNBT), 5-бром-4-хлор-3-индоксил-бета-D-галактозид/ферро-феррицианид (BCIG/FF).

Примеры широко используемых субстратов для щелочной фосфатазы включают нафтол-AS-B 1-фосфат/быстрый красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/быстрый красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/быстрый красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/быстрый красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/новый фусцин (NABP/NF), бромхлориндолил фосфат/нитро синий тетразолий (BCIP/NBT), 5-бром-4-хлор-3-индолил-b-d-галактопиранозид (BCIG).

Примеры люминесцентных меток включают люминол, изолюминол, сложные эфиры акридиния, 1,2-диоксетаны и пиридопиридазины. Примеры электрохемилюминесцентных меток включают производные рутения. Примеры

радиоактивных меток включают изотопы йодида, кобальта, селена, трития, углерода, серы и фосфора.

Поддающиеся детекции метки могут быть связаны с антителами, описанными в настоящем описании (т.е. любые из антител, специфичных к зрелому фактору D, антител, специфичных к профактору D, или антител против фактора D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D) или с любой другой молекулой, которая специфически связывается с представляющим интерес биологическим маркером, например, антитело, зонд на основе нуклеиновой кислоты или полимер. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что поддающиеся детекции метки также могут быть конъюгированы со вторым, и/или третьим, и/или четвертым, и/или пятым связывающими агентами или антителами, и т.д. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что любой дополнительный связывающий агент или антитело, используемые для охарактеризации представляющего интерес биологического маркера, могут служить в качестве стадии усиления сигнала. Детекцию биологического маркера можно проводить визуально с использованием, например, световой микроскопии, флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии, где поддающееся детекции вещество представляет собой, например, краситель, частицу из коллоидного золота, люминесцентный реагент. Детекцию поддающихся визуальной детекции веществ, связанных с биологическим маркером, также можно проводить с использованием спектрофотометра. Когда поддающееся детекции вещество представляет собой радиоактивный изотоп, детекцию можно проводить визуально посредством радиоавтографии или не визуально с использованием сцинтилляционного счетчика. См., например, Larsson, 1988, *Immunocytochemistry: Theory and Practice*, (CRC Press, Boca Raton, Fla.); *Methods in Molecular Biology*, vol. 80 1998, John D. Pound (ed.) (Humana Press, Totowa, N.J.).

В другом варианте осуществления антитело против фактора D является немеченым (т.е. является голым), и детекцию его присутствия можно проводить с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом против фактора D (т.е. любые из антител, специфичных к зрелому фактору D, антител, специфичных к профактору D, или антител против фактора D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D).

V. Композиции и наборы, содержащие антитела против фактора D

Композиции

В другом аспекте настоящее изобретение относится к подложке, такой как твердая подложка (например, нерастворимая подложка, такая как неводная матрица, такая как планшет или предметное стекло, изготовленные из стекла, полисахаридов (например, агароза), полиакриламидов, полистирола, пластмассы или металла, покрытые полимером шарики, пробирка или керамический или металлический чип), которая содержит иммобилизованные (или иным образом депонированные) моноклональные антитела против фактора D, описанные в настоящем описании (такие как антитела, специфичные к

зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D). В некоторых вариантах осуществления антитела против фактора D иммобилизованы (или депонированы) локализованным образом (например, в лунках многолуночного планшета или в матрице на биочипе). В некоторых вариантах осуществления подложка, содержащая антитела против фактора D, может быть частью набора для детекции фактора D (такого как зрелый фактор D, профактор D или общий фактор D (зрелый и профактор D) в биологическом образце, полученном от млекопитающего.

Наборы

В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам для применения для проведения одного или нескольких способов анализа, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору (т.е. упакованная комбинация реагентов в заданных количествах) с реагентами и инструкциями для обнаружения наличия фактора D (такого как зрелый фактор D, профактор D или общий фактор D (зрелый и профактор D)) в тестируемом образце, таком как биологический образец. Иллюстративные наборы могут содержать по меньшей мере одно моноклональное антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем описании (т.е. любые из антител, специфичных к зрелому фактору D, антител, специфичных к профактору D, или антител против фактора D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D). Когда антитело против фактора D является меченым поддающейся детекции частью, такой как фермент, набор включает субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который предоставляет поддающийся детекции хромофор или флуорофор). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут широко варьироваться для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предоставлены в качестве сухих порошков, обычно лиофилизированных, включающих эксципиенты, которые при растворении обеспечивают раствор реагентов, имеющих соответствующую концентрацию.

Кроме того, наборы могут включать инструкции, в которых описаны способы применения антитела по настоящему изобретению (например, для детекции зрелого фактора D или профактора D в качестве биомаркера активации альтернативного пути комплемента (APC) или ее отсутствия). Наборы также могут включать дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого набор предназначен. Например, набор может дополнительно содержать поддающуюся детекции метку (например, субстраты ферментов для ферментных меток, наборы фильтров для детекции флуоресцентных меток, подходящие вторичные метки, такие как антитело овцы против антител мыши с HRP и т.п.). Наборы могут дополнительно включать буферы и другие

реагенты, обычно используемые для применения конкретного иммуноанализа на практике, как хорошо известно в данной области.

В определенных вариантах осуществления предусматриваются наборы для детекции наличия или количества зрелого фактора D в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно антитело, специфичное к зрелому фактору D, как описано в настоящем описании, такое как антитело или фрагмент, содержащие CDR из клонов, специфичных к зрелому фактору D, 6G6, 14A11, 27B3, 58F5, 49G3 и 10G1, как указано в таблице 2. В определенных вариантах осуществления набор может содержать буферы, ферменты, метки, субстраты, шарики или другие поверхности, к которым присоединены антитела по изобретению, и т.п., и инструкции по применению.

Определенные варианты осуществления предусматривают наборы для детекции наличия или количества профактора D в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно антитело, специфичное к профактору D, как описано в настоящем описании, такое как антитело или фрагмент, содержащие CDR из клонов, специфичных к профактору D: 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, как указано в таблице 4. Рассматриваемые антитела против фактора D и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть мечены любой подходящей поддающейся детекции частью, как описано в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления набор может содержать буферы, ферменты, метки, субстраты, шарики или другие поверхности, к которым могут быть присоединены антитела по изобретению, и т.п., и инструкции по применению.

Предметы в наборе могут быть индивидуально обернуты или упакованы в индивидуальную тару, и предоставлены вместе в более крупном контейнере (например, картонная или пенополистероловая коробка).

В соответствии с вышеуказанным, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору, содержащему по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое осуществляет специфическую детекцию или количественное определение зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3) и/или профактора D (SEQ ID NO:2) в иммуноанализе, где по меньшей мере одно моноклональное антитело содержит: (i) моноклональное антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, охватывающим N-конец зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5) и где указанное антитело не связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2); и/или (ii) моноклональное антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4) и где указанное антитело не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-

17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит антитело против фактора D, или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), так и для профактора D (SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах осуществления антитело против фактора D или его фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит по меньшей мере один контейнер.

В некоторых вариантах осуществления набор предназначен для проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент представляет собой антитело покрытия. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент, представляет собой антитело детекции. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент представляет собой антитело покрытия. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент представляет собой антитело детекции.

В различных вариантах осуществления наборов по изобретению рассматриваемые антитела против фактора D и их антигенсвязывающие фрагменты (т.е. антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и/или антитела против фактора D) могут быть мечены соответствующей поддающейся детекции частью, как описано в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления набор дополнительно содержит буферы, ферменты, метки, субстраты, шарики или другие поверхности, к которым присоединены антитела по изобретению, и т.п., и инструкции по применению.

VI. Способы детекции фактора D с использованием антител против фактора D

Как описано в настоящем описании, авторы изобретения получили антитела против фактора D, которые являются пригодными для применения в иммуноанализе для детекции наличия и/или количества фактора D (такого как зрелый фактор D, профактор D и общий

фактор D (как зрелая форма, так и про-форма фактора D) в тестируемом образце, таком как биологический образец, полученный от млекопитающего.

В одном аспекте антитела против фактора D (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D) по настоящему изобретению используют в иммуноанализе *in vitro* для анализа тестируемого образца, такого как биологический образец, полученный от тестируемого индивидуума, в отношении наличия или количества профактора D, зрелого фактора D и/или общего фактора D. В таких способах иммуноанализа *in vitro* антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть голыми или могут быть мечеными поддающейся детекции частью, как описано в настоящем описании, и могут использоваться в жидкой фазе или связанными с подложкой, как описано ниже. Для целей анализа *in vitro* можно использовать любой тип антитела, такой как антитело мыши, химерное, гуманизованное или человека, поскольку нет необходимости учитывать иммунный ответ хозяина.

Антитела по настоящему изобретению могут использоваться в любом известном способе иммуноанализа, таком как конкурентный анализ связывания, прямой и непрямой сэндвич-анализ, иммунохроматографический анализ (например, формат тест-полоски) и анализ иммунопреципитации (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Сэндвич-анализ вовлекает применение двух антител, каждое из которых способно связываться с отличающейся иммуногенной частью, эпитопом, белка, подлежащего детекции (например, фактора D). В сэндвич-анализе анализируемое соединение тестируемого образца связывают первым антителом (например, антитело против фактора D, такое как антитело, специфичное к зрелому фактору D, антитело, специфичное к профактору D, и/или антитело, которое связывается как со зрелым фактором D, так и с профактором D), которое иммобилизовано на твердой основе (например, подложке), и после этого второе антитело связывается с анализируемым соединением, таким образом, образуя нерастворимый трехкомпонентный комплекс. Второе антитело само по себе может быть меченым поддающейся детекции частью (прямой сэндвич-анализ) или может быть количественно определено с использованием антитела против иммуноглобулина, которое мечено поддающейся детекции частью (непрямой сэндвич-анализ).

Например, одним предпочтительным типом сэндвич-анализа является анализ ELISA, в случае которого поддающейся детекции частью является фермент. Анализ ELISA, независимо от используемой системы детекции, обычно включает иммобилизацию антигена или антитела на подложке (например, твердой основе), а также применение подходящего реагента для детекции. В анализе ELISA реакция белковый антиген-антитело происходит на подложке (например, твердой основе), как правило, в лунках микропланшетов для титрования. Антиген и это первое антитело, также

называемое антителом покрытия или антителом захвата, реагируют и образуют стабильный комплекс, который может быть визуализирован добавлением второго антитела, называемого антителом детекции, которое может быть прямо или непрямо связано с ферментом. Добавление субстрата для фермента приводит к развитию окраски, которая может быть измерена фотометрически.

В одном варианте осуществления антитела против фактора D (включая антитела, специфичные к зрелому фактору D, антитела, специфичные к профактору D, и антитела против фактора-D, которые связывают как зрелую форму, так и про-форму фактора D) по изобретению используют для детекции наличия зрелой формы или про-формы антигена-фактора D в биологическом образце с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (см., например, Gold et al. *J Clin Oncol.* 24:252-58, 2006).

В прямом конкурентном ELISA чистый или получистый препарат антигена связывают с подложкой, которая является нерастворимой в тестируемой жидкости или клеточном экстракте, и добавляют некоторое количество меченого поддающейся детекции меткой растворимого антитела для обеспечения возможности детекции и/или количественного определения бинарного комплекса, образованного между связанным с подложкой антигеном и меченым антителом.

Напротив, ELISA "с двойной детерминантой", также известный как "двухслойный ELISA" или "сэндвич-анализ", требует небольших количеств антигена, и этот анализ не требует тщательной очистки антигена. Таким образом, ELISA с двойной детерминантой является предпочтительным относительно прямого конкурентного ELISA для детекции антигена в клиническом образце. См., например, применение ELISA с двойной детерминантой для количественного определения онкобелка c-мус в биоптатах. Field et al., *Oncogene* 4: 1463 (1989); Spandidos et al., *AntiCancer Res.* 9: 821 (1989). В ELISA с двойной детерминантой некоторое количество немеченого моноклонального антитела или фрагмента антитела ("антитело захвата") связывают с подложкой (например, твердой основой), тестируемый образец приводят в контакт с антителом захвата и добавляют некоторое количество меченого поддающейся детекции меткой растворимого антитела (или фрагмента антитела) для обеспечения возможности детекции и/или количественного определения трехкомпонентного комплекса, образованного антителом захвата, антигеном и меченым антителом.

В одном варианте осуществления антитело захвата, связанное с подложкой (например, твердой основой), представляет собой антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем описании, которые связываются с эпитопом, который является общим как для профактора D, так и для зрелого фактора D (т.е. в C-концевой части фактора D). В одном варианте осуществления антитело захвата, связанное с подложкой (например, твердой подложкой), представляет собой антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления антитело захвата, связанное с

подложкой (например, твердой подложкой), представляет собой антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем описании.

Способы проведения ELISA с двумя детерминантами хорошо известны специалистами в данной области. См., например, Field et al., *Oncogene* 4: 1463 (1989); Spandidos et al., *AntiCancer Res.* 9: 821 (1989); и Moore et al., *Methods in Molecular Biology* Vol 10:273-281 (The Humana Press, Inc. 1992).

В ELISA с двойной детерминантой растворимое антитело или фрагмент антитела должны связываться с эпитопом фактора D, который отличается от эпитопа, распознаваемого антителом захвата. ELISA с двойной детерминантой можно проводить для установления того, присутствует ли антиген фактора D (т.е. зрелый фактор D или профактор D) в тестируемом биологическом образце, таком как жидкость организма (например, кровь, плазма или сыворотка) или биоптат. Альтернативно, анализ можно проводить для количественного определения антигена фактора D, который присутствует в клиническом образце жидкости организма. Количественный анализ можно проводить путем включения разведений очищенного антигена фактора D.

Можно проводить иммуноанализ *in vitro*, в котором по меньшей мере одно антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело, специфичное к зрелому фактору D, антитело, специфичное к профактору D, и/или антитело против фактора D, которое связывает как зрелую форму, так и про-форму фактора D) связано с подложкой (например, твердофазным носителем). Например, моноклональные антитела против фактора D или их фрагменты могут быть связаны с полимером, таким как аминокислоты, для связывания моноклонального антитела с нерастворимой подложкой, такой как покрытые полимером шарики, планшет, пробирка или керамический или металлический чип. В одном варианте осуществления подложка является пригодной для применения в способе ELISA (например, многолуночный планшет для микротитрования). Таким образом, определение уровня фактора D (такого как зрелый фактор D, профактор D, или как зрелый фактор D, так и профактор D) в образце можно проводить посредством коммерчески доступных способов, таких как анализ на основе ELISA, химическое или ферментативное определение белка.

Другие подходящие способы анализа *in vitro* будут хорошо понятны специалистам в данной области. Конкретные концентрации меченого поддающейся детекции антитела против фактора D, температура и время инкубации, а также другие условия анализа, могут варьироваться, в зависимости от различных факторов, включающих концентрацию антигена фактора D в образце, природу образца и т.п. Активность связывания антитела против D с образцом можно определять хорошо известными способами. Специалисты в данной области способны определить эффективные и оптимальные условия анализа для каждого определения с использованием рутинного экспериментирования.

В другом варианте осуществления рассматриваемые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться для детекции наличия антигена

фактора D в срезах тканей, полученных из гистологического образца (например, биоптат). Такую детекцию *in situ* можно использовать для определения наличия антигена фактора D и для определения распределения антигена фактора D в исследуемой ткани. Детекцию *in situ* можно проводить путем нанесения меченого поддающейся детекции меткой антитела против фактора D на срезы тканей. Основные способы детекции *in situ* хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application", Mammalian Development: A Practical Approach 113-38 Monk (ed.) (IRL Press 1987).

А. Способы анализа для детекции зрелого фактора D

В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, таком как а биологический образец, причем способ включает (а) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом, специфичным к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающим фрагментом в иммуноанализе *in vitro* и (b) детекцию наличия или отсутствия связывания указанного антитела, где наличие связывания указывает на наличие или количество зрелого фактора D в образце. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его фрагмент связывается с эпитопом на N-концевой области зрелого фактора D человека, где указанный эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5) и где антитело не связывается с профактором D.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: а) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность X SXMGVS (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность HIYWDDEKHYXPSLKK (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность RYYGYXXXMXU (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где

X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHPPT (SEQ ID NO:54). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело, содержащее CDR из клонов, специфичных к зрелому фактору D: 6G6, 14A11, 27B3, 58F5, 49G3 и 10G1, как указано в таблице 2.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает сравнение количества зрелого фактора D, детектированного в соответствии со стадией (b), с эталонным стандартом или контрольным образцом для определения уровня зрелого фактора D в тестируемом образце.

В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или объединенный образец от индивидуумов, страдающих от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем (например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), С3-гломерулопатия или другое заболевание или нарушение, обусловленные альтернативным путем). В одном варианте осуществления контрольным образцом является индивидуальный или объединенный образец от нормальных здоровых добровольцев. В одном варианте осуществления контрольным образцом является исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента (например, ингибирующее MASP-3 средство или другой ингибитор комплемента). В одном варианте осуществления эталонным стандартом является по меньшей мере одно из соотношений: профактор D относительно зрелого фактора D или зрелый фактор D относительно общего фактора D, где соотношение получают в тестируемом образце или контрольном образце (например, индивидуальный или объединенный образец нормальных здоровых добровольцев, или исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента, или индивидуальный или объединенный образец индивидуума(ов), страдающего от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем). В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке. В одном варианте осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, является меченым поддающейся детекции частью, и стадия (b) включает детекцию наличия указанной поддающейся детекции части. В одном варианте осуществления указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или

антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и детекцию наличия или количества антитела или его фрагмента, связанного со зрелым фактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом против зрелого фактора D. В одном варианте осуществления указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/нанесение), и детекцию связанного зрелого фактора D проводят с использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D (например, антитело против фактора D, которое связывается с эпитопом, общим для зрелого фактора D и профактора D, как описано в настоящем описании).

В одном варианте осуществления тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего. В различных вариантах осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мокроты, амниотической жидкости, цереброспинальной жидкости, клеточного лизата, асцитной жидкости, мочи, слюны и ткани. В одном варианте осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

В одном варианте осуществления млекопитающее (например, человек) страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения альтернативного пути. В одном варианте осуществления млекопитающее страдает от или имеет риск развития заболевания почек, при котором нарушено выведение фактора D комплемента вследствие снижения функции почек.

В одном варианте осуществления млекопитающее (например, человек) лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело), как дополнительно описано в настоящем описании.

Как описано в настоящем описании, способы детекции зрелого фактора D в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения могут использоваться для определения фармакодинамического конечного результата или терапевтического порога ингибитора комплемента, такого как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело).

Хотя детали иммуноанализа могут варьироваться в зависимости от конкретного используемого формата, способ детекции зрелого фактора D в тестируемом образце включает стадии приведения тестируемого образца в контакт с антителом, которое специфически связывается со зрелым фактором D. Антителу позволяют связываться со зрелым фактором D в образце в иммунологически реактивных условиях, и детекцию присутствия связанного антитела проводят прямо или непрямо. Антитела, специфичные к зрелому фактору D, можно использовать, например, в качестве антитела захвата в ELISA, или в качестве второго антитела для связывания со зрелым фактором D, захваченным антителом захвата. Как известно в данной области, затем обычно проводят детекцию

присутствия второго антитела. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ проводят на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

В. Способы анализа профактора D

В соответствии с вышеуказанным, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем способ включает (а) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом, специфичным к профактору D, или его антигенсвязывающим фрагментом в иммуноанализе *in vitro* и (b) детекцию наличия или отсутствия связывания указанного антитела, где наличие связывания указывает на наличие или количество профактора D в образце. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D человека, или его фрагмент связывается с эпитопом в активационном ("Pro") пептиде фактора D человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4), где антитело или его фрагмент специфически связывается профактор D человека (SEQ ID NO:2) и не связывается со зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент содержат связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) CDR-H1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) CDR-H2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) а CDR-H3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) CDR-L1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) CDR-L2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) CDR-L3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID

NO:200.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфичное к профактору D, или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело, содержащее CDR из клонов, специфичных к профактору D: 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, как указано в таблице 4.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает сравнение количества профактора D, детектированного в соответствии со стадией (b), с эталонным стандартом или контрольным образцом для определения уровня профактора D в тестируемом образце.

В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или объединенный образец от индивидуумов, страдающих от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем (например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), С3-гломерулопатия или другое заболевание или нарушение, обусловленные альтернативным путем). В одном варианте осуществления контрольным образцом является индивидуальный или объединенный образец от нормальных здоровых добровольцев. В одном варианте осуществления контрольным образцом является исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента (например, ингибирующее MASP-3 средство или другой ингибитор комплемента). В одном варианте осуществления эталонным стандартом является по меньшей мере одно из соотношений: профактор D относительно зрелого фактора D или профактор D относительно общего фактора D, где соотношение получают в тестируемом образце или контрольном образце (например, индивидуальный или объединенный образец нормальных здоровых добровольцев, или исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента, или индивидуальный или объединенный образец индивидуума(ов), страдающего от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке. В одном варианте осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

В одном варианте осуществления антитело, специфичное к профактору D человека, является меченым поддающейся детекции частью, и стадия (b) включает детекцию наличия указанной поддающейся детекции части. В одном варианте осуществления указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и детекцию наличия или количества антитела или его фрагмента, связанного с профактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом против профактора D. В одном варианте осуществления указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/нанесение), и детекцию связанного профактора D проводят с использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D (например, антитело против фактора D,

которое связывается с эпитопом, общим для зрелого фактора D и профактора D, как описано в настоящем описании).

В одном варианте осуществления тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего. В различных вариантах осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мокроты, амниотической жидкости, цереброспинальной жидкости, клеточного лизата, асцитной жидкости, мочи, слюны и ткани. В одном варианте осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

В одном варианте осуществления млекопитающее (например, человек) страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения альтернативного пути. В одном варианте осуществления млекопитающее страдает от или имеет риск развития заболевания почек, при котором нарушено выведение фактора D комплемента вследствие снижения функции почек.

В одном варианте осуществления млекопитающее (например, человек) лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело), как дополнительно описано в настоящем описании.

Как описано в настоящем описании, способы детекции профактора D в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения могут использоваться для определения фармакодинамического конечного результата или терапевтического порога ингибитора комплемента, такого как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело). В одном варианте осуществления млекопитающее (например, человека) лечат ингибирующим MASP-3 средством, таким как ингибирующее MASP-3 антитело, как дополнительно описано в настоящем описании.

Хотя детали иммуноанализа могут варьироваться в зависимости от конкретного используемого формата, способ детекции профактора D в тестируемом образце включает стадии приведения тестируемого образца в контакт с антителом, которое специфически связывается с профактором D. Антителу позволяют связываться с профактором D в образце в иммунологически реактивных условиях, и детекцию присутствия связанного антитела проводят прямо или непрямо. Антитела, специфичные к профактору D, можно использовать, например, в качестве антитела захвата в ELISA, или в качестве второго антитела для связывания с профактором D, захваченным антителом захвата. Как известно в данной области, затем обычно проводят детекцию присутствия второго антитела. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ проводят на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

VII. Способы диагностики, мониторинга и лечения индивидуума, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем

Антитела против фактора D по изобретению, способы, реагенты и наборы могут использоваться в ряде применений. Например, в определенных вариантах осуществления анализ по настоящему изобретению может использоваться для оценки уровня зрелого фактора D и/или профактора D у индивидуума и/или для оценки степени, с которой ингибитор пути комплемента, такой как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело) влияет на уровень зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученного от индивидуума, и, таким образом, для оценки степени активации APC у указанного индивидуума. В некоторых вариантах осуществления анализ по настоящему изобретению может использоваться для оценки степени, с которой ингибитор пути комплемента (например, ингибирующее MASP-3 средство) снижает активацию альтернативного пути комплемента *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению проводят на биологическом образце, полученном от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления уровень зрелого фактора D и/или профактора D, выявленный в анализе по изобретению, сравнивают с подходящей эталонной величиной. Эталонная величина может представлять собой, например, величину, измеренную в образце, полученном от здорового пациента (или группы здоровых пациентов), или величину, измеренную в образце, полученном от пациента, которому проведено лечение ингибирующим MASP-3 средством (например, полученный до лечения или в некоторый момент времени после лечения), или эталонная величина может представлять собой заданную пороговую величину. В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или объединенный образец от индивидуумов, страдающих от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем (например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), С3-гломерулопатия или другое заболевание или нарушение, обусловленные альтернативным путем). В одном варианте осуществления контрольным образцом является индивидуальный или объединенный образец от нормальных здоровых добровольцев. В одном варианте осуществления контрольным образцом является исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента (например, ингибирующее MASP-3 средство или другой ингибитор комплемента). В одном варианте осуществления эталонным стандартом является по меньшей мере одно из соотношений: профактор D относительно зрелого фактора D, зрелый фактор D относительно общего фактора D, или профактор D относительно общего фактора D, где соотношение получают в тестируемом образце или контрольном образце (например, индивидуальный или объединенный образец нормальных здоровых добровольцев, или исходный образец индивидуума до лечения ингибитором комплемента, или индивидуальный или объединенный образец индивидуума(ов), страдающего от заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем).

А. Способы оценки степени активации альтернативного пути комплемента у млекопитающего

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам оценки степени активации альтернативного пути комплемента (АРС) в тестируемом образце и проведения иммуноанализа, включающего захват и детекцию зрелого фактора D в тестируемом образце и/или захват и детекцию профактора D в тестируемом образце, где уровень зрелого фактора D и/или уровень профактора D, детектированный в тестируемом образце, указывает на степень активации альтернативного пути комплемента в тестируемом образце. В одном варианте осуществления тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего, и способ включает стадии: (a) предоставления биологического образца, полученного от млекопитающего; и (b) оценки степени активации АРС у индивидуума путем проведения иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из захвата и детекции зрелого фактора D в биологическом образце; и/или захвата и детекции профактора D в биологическом образце в соответствии со способами по изобретению, описанными в настоящем описании. Например, в одном варианте осуществления иммуноанализ включает захват и детекцию зрелого фактора D в тестируемом образце, где зрелый фактор D либо захватывается, либо детектируется моноклональным антителом, специфичным к зрелому фактору D, или его фрагментом, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D. В одном варианте осуществления иммуноанализ включает захват и детекцию профактора D в тестируемом образце, где профактор D либо захватывается, либо детектируется моноклональным антителом, специфичным к профактору D, или его фрагментом, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующим в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D. В различных вариантах осуществления способ включает сравнение уровня зрелого фактора D, выявленного в образце (например, биологическом образце), с заданным уровнем или контрольным образцом и/или сравнение уровня профактора D, выявленного в образце, с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень зрелого фактора D и/или профактора D, выявленный в тестируемом образце, указывает на степень активации альтернативного пути комплемента в тестируемом образце (например, биологическом образце). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает использование результата сравнительного анализа для получения диагностической, прогностической или связанной с лечением информации, касающейся млекопитающего, из которого получен биологический образец. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки эффекта ингибитора комплемента человека на альтернативный путь активации комплемента *in vivo*. В соответствии с настоящим изобретением можно использовать любое соединение, которое связывает или иным образом блокирует образование и/или активность любого из компонентов комплемента человека. Например, ингибитор комплемента может представлять собой низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты, пептидомиметик или макромолекулу, которая не является

нуклеиновой кислотой, или белок, такой как антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки эффекта активации альтернативного пути комплемента *in vivo* ингибитором (например, антитело или низкомолекулярное соединение), специфичным к компоненту комплемента человека, например, ингибитором компонента комплемента, выбранным из группы, состоящей из C1 (C1q, C1r, C1s), C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, фактора D, фактора В, фактора Р, MBL, MASP-1, MASP-2 и MASP-3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки эффекта ингибитора альтернативного пути комплемента на активацию альтернативного пути комплемента. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки эффекта ингибитора созревания профактора D на активацию альтернативного пути комплемента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки эффекта на активацию альтернативного пути комплемента *in vivo* ингибирующего MASP-3 средства, которое вводят млекопитающему. В различных вариантах осуществления ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело) вводят млекопитающему, а затем получают биологический образец. Затем оценивают степень активации альтернативного пути комплемента (APC) в биологическом образце путем проведения иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из захвата и детекции зрелого фактора D в биологическом образце; и/или захвата и детекции профактора D в биологическом образце в соответствии со способами по изобретению, описанными в настоящем описании.

В. Способы мониторинга эффективности ингибирующего MASP-3 антитела у млекопитающего

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу мониторинга эффективности лечения ингибирующим MASP-3 антителом у млекопитающего, причем способ включает стадии (a) введения дозы ингибирующего MASP-3 антитела млекопитающему в первый момент времени; (b) оценку первой концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (a); (c) введения индивидууму ингибирующего MASP-3 антитела во второй момент времени; (d) оценку второй концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (c); и (e) сравнения уровня зрелого фактора D и/или профактора D, оцененного на стадии (b), с уровнем зрелого фактора D и/или профактора D, оцененным на стадии (d), для определения эффективности ингибирующего MASP-3 антитела у млекопитающего. В одном варианте осуществления степень активации APC у индивидуума оценивают в иммуноанализе, где иммуноанализ включает захват и детекцию уровня зрелого фактора D в биологическом образце. Необязательно уровень зрелого фактора D, детектированный в биологическом образце, сравнивают с подходящей эталонной величиной. Эталонная величина может представлять собой, например, величину для зрелого фактора D, измеренную в биологическом образце, полученном от

индивидуума перед введением ингибирующего MASP-3 антитела, среднюю величину, измеренную в образцах, полученных от группы здоровых контрольных индивидуумов, величину, которая отражает желаемую степень активации APC (например, уровень зрелого фактора D, соответствующий 90% ингибированию APC, или 80% ингибированию, или 70% ингибированию, или 60% ингибированию, или 50% ингибированию APC). Например, первый биологический образец получают от индивидуума до введения ингибирующего MASP-3 антитела и второй биологический образец получают после введения ингибирующего MASP-3 антитела, и в образцах определяют уровень зрелого фактора D. Если уровень зрелого фактора D во втором биологическом образце является меньшим, чем уровень зрелого фактора D в первом биологическом образце, или является меньшим, чем контрольная величина (например, пороговая величина, соответствующая процентному ингибированию APC), можно сделать заключение, что ингибирующее MASP-3 ингибирует активацию APC в желаемой степени. Альтернативно, если уровень зрелого фактора D во втором биологическом образце превышает уровень зрелого фактора D в первом биологическом образце, или превышает уровень в контрольном образце (например, пороговая величина, соответствующая процентному ингибированию APC), можно сделать заключение, что дозировку ингибирующего MASP-3 антитела следует увеличить, и необязательно способ дополнительно включает введение увеличенной дозировки ингибирующего MASP-3 антитела индивидууму. В некоторых вариантах осуществления, если индивидууму вводят увеличенную дозу ингибирующего MASP-3 антитела, стадии (b)-(e) повторяют для определения того, является ли увеличенная доза ингибирующего MASP-3 антитела достаточной для доведения уровня зрелого фактора D до желаемого уровня по сравнению с соответствующим контролем или эталонным стандартом.

В другом варианте осуществления степень активации APC у млекопитающего оценивают в иммуноанализе, где иммуноанализ включает захват и детекцию уровня профактора D в биологическом образце. Необязательно, уровень профактора D, детектированный в биологическом образце, сравнивают с подходящей эталонной величиной. Эталонная величина может представлять собой, например, величину уровня профактора D, измеренную в биологическом образце, полученном от индивидуума до введения ингибирующего MASP-3 антитела, среднюю величину, измеренную в образцах, полученных от группы здоровых контрольных индивидуумов, величину, которая соответствует желаемой степени активации APC (например, уровень профактора D, соответствующий 90% ингибированию APC, или 80% ингибированию, или 70% ингибированию, или 60% ингибированию, или 50% ингибированию APC). Например, первый биологический образец получают от индивидуума до введения ингибирующего MASP-3 антитела и второй биологический образец получают после введения ингибирующего MASP-3 антитела, и в образцах определяют уровень профактора D. Если уровень профактора D во втором биологическом образце является меньшим, чем уровень профактора D в первом биологическом образце, или является меньшим, чем контрольная

величина (например, пороговая величина, соответствующая процентному ингибированию APC), можно сделать заключение, что ингибирующее MASP-3 ингибирует активацию APC в желаемой степени. Альтернативно, если уровень профактора D во втором биологическом образце превышает уровень профактора D в первом биологическом образце, или превышает уровень в контрольном образце (например, пороговая величина, соответствующая процентному ингибированию APC), можно сделать заключение, что дозировку ингибирующего MASP-3 антитела следует увеличить, и необязательно способ дополнительно включает введение увеличенной дозировки ингибирующего MASP-3 антитела индивидууму. В некоторых вариантах осуществления, если индивидууму вводят увеличенную дозу ингибирующего MASP-3 антитела, стадии (b)-(e) повторяют для определения того, является ли увеличенная доза ингибирующего MASP-3 антитела достаточной для доведения уровня профактора D до желаемого уровня по сравнению с соответствующим контролем или эталонным стандартом.

В некоторых вариантах осуществления способы используют для мониторинга эффективности ингибирующего MASP-3 антитела, которое вводят индивидууму, страдающему от или имеющему риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, например, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиеелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), C3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

С. Способы лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, включающему введение ингибирующего MASP-3 антитела индивидууму, если определено, что индивидуум имеет:

(i) более низкий или сниженный уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем D или по сравнению с уровнем профактора D в одном или нескольких контрольных образцах: и/или (ii) более высокий или повышенный уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем зрелого фактора D или по сравнению с уровнем зрелого фактора D в одном или нескольких контрольных образцах. В одном варианте осуществления уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа, включающего применение моноклонального антитела, специфичного к зрелому фактору D. В одном варианте осуществления уровень зрелого профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа, включающего применение моноклонального антитела, специфичного к профактору D.

В некоторых вариантах осуществления способы используют для лечения человека, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, например, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиеелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), C3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA- васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

VIII. Ингибирующие MASP-3 средства

Полипептид MASP-3 человека (SEQ ID NO:7, из Genbank AAK84071.1) имеет 728 аминокислотных остатков, которые включают лидерный пептид из 19 остатков. Как отмечалось выше, было продемонстрировано, что MASP-3 ответственна за конвертирование фактора D комплемента из проферментной формы белка (т.е. профактора D) в зрелую форму (т.е. зрелый фактор D), что, таким образом, делает MASP-3 ключевой вышестоящей регуляторной стадией для альтернативного пути. Таким

образом, при применении на практике различных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения репрезентативные ингибирующие MASP-3 средства включают средство, которое связывается или прямо взаимодействует с MASP-3, указанной под SEQ ID NO:7, включая антитела против MASP-3 и их связывающие MASP-3 фрагменты, низкомолекулярные соединения и ингибиторы экспрессии, которые ингибируют активацию альтернативного пути комплемента. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирующее MASP-3 средство является специфичным к MASP-3 и не связывается с MASP-1 или MASP-2. Примером ингибирующего MASP-3 средство является специфичное к MASP-3 ингибирующее средство, такое как ингибирующее MASP-3 средство, которое специфически связывается с частью MASP-3 человека (SEQ ID NO:7) с аффинностью связывания, по меньшей мере в 10 раз превышающей аффинность связывания других компонентов системы комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 средство представляет собой высокоаффинное антитело против MASP-3, которое специфически связывается с доменом сериновой протеазы MASP-3 человека (SEQ ID NO:7) с аффинностью менее 500 пМ. В предпочтительном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 средство, такое как антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий пептид, ингибирует опосредуемое MASP-3 созревание фактора D. Ингибирующие MASP-3 средства, пригодные в способе по изобретению, могут снижать MASP-3-зависимую активацию альтернативного пути комплемента более чем на 10%, например, более чем на 20%, более чем на 50%, или более чем на 90%. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 средство снижает MASP-3-зависимую активацию альтернативного пути комплемента более чем на 90% (т.е. обеспечивая активацию комплемента посредством MASP-3 только на 10% или менее).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 средство, пригодное в способах по изобретению, представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с доменом сериновой протеазы в MASP-3 человека (аминокислотные остатки 450-728 SEQ ID NO:7) с высокой аффинностью (с K_D менее 500 пМ), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активацию альтернативного пути комплемента. Например, как описано в WO2018/026722, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, и как дополнительно описано в примерах 10 и таблицах 18-20 настоящего описания, были получены многочисленные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела, которые связывают домен сериновой протеазы в MASP-3 и ингибируют его каталитическую активность. Как дополнительно описано в WO2018/026722, несколько репрезентативных ингибирующих MASP-3 антител (например, 4D5, 10D12 и 13B1) были гуманизированы. Репрезентативные гуманизированные ингибирующие MASP-3 антитела описаны ниже.

Таким образом, в одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 средство для применения в композициях и способах в соответствии с заявленным изобретением включает моноклональное антитело, которое связывает полипептид, состоящий из MASP-

3 человека (SEQ ID NO:7), где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с MASP-3 и содержит: по меньшей мере одно из следующих:

(i) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(ii) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTHTFPWT); или

(iii) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

В одном варианте осуществления моноклональное антитело против MASP-3 содержит вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью по меньшей мере с одной из SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:228, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью по меньшей мере с одной из SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224 или SEQ ID NO:227. В одном варианте осуществления моноклональное антитело против MASP-3 содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:220 или SEQ ID NO:222, и легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:221. В одном варианте осуществления моноклональное антитело против MASP-3 содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:223 или SEQ ID NO:225, и легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:224. В одном варианте осуществления моноклональное антитело против MASP-3 содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:228, и легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:227.

XIV. Фармацевтические композиции и изделия

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибирующее MASP-3 антитело в водном растворе,

содержащем буферную систему, имеющую pH $6,0 \pm 5\%$, $20 \pm 5\%$ mM гистидин, $100 \pm 5\%$ мг/мл сахарозы и $0,035\% \pm 5\%$, полисорбата 80, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело включено в концентрации $110 \text{ мг/мл} \pm 5\%$, и где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT). В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:227, и переменную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:227. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, антитела мыши и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмент, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и целого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело дополнительно содержит константную область иммуноглобулина. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека с мутацией S228P. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит мутацию, которая способствует взаимодействиям FcRn при низком значении pH, например, где ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека, указанную под SEQ ID NO:245.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к изделию, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую ингибирующее MASP-3 антитело в единичной дозированной форме, пригодной для терапевтического введения человеку, такой как единичная дозировка в диапазоне от 10 мг до 1000 мг (такая как от 50 мг до 800 мг, или от 75 мг до 500, такая как от 100 мг до 300 мг, такая как от 125 до 275 мг, такая как от 150 до 200 мг, такая как $150 \pm 5\%$ мг, $155 \pm 5\%$ мг, $160 \pm 5\%$ мг, $165 \pm 5\%$ мг, $170 \pm 5\%$ мг, $175 \pm 5\%$ мг, $180 \pm 5\%$ мг, $185 \pm 5\%$ мг или $190 \pm 5\%$ мг) ингибирующего MASP-3 антитела, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235

(EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

В некоторых вариантах осуществления изделие содержит контейнер и ярлык или вкладыш в упаковку на контейнере или прилагаемый к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, ампулы, пакеты (например, пакет для внутривенной инфузии), флаконы, шприцы, кассеты и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения состояния и может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, проницаемую для иглы для подкожной инъекции). По меньшей мере одно активное вещество в композиции представляет собой ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. На ярлыке или вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения конкретного состояния. Ярлык или вкладыш в упаковку, кроме того, содержит инструкции по введению композиции антитела пациенту.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и изделия, описанные в настоящем описании, предназначены для лечения индивидуума, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР) или ассоциированную с трансплантацией ТМА), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA- васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

Иллюстративные варианты осуществления

A. MAб, специфичные к зрелому фактору D:

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5).
2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, где антитело специфически связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и не связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2).
3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1 или абзацу 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-3, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.
5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.
6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело представляет собой одноцепочечную молекулу.
7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.
8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает зрелый фактор D человека с K_D менее 10 нМ.
9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-8, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.
10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-9, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.
11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-10, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.
12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий

домен, содержащий следующие шесть CDR: а) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSXMGVS (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность HIYWDDEKHYXPSLKX (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность RYYGYXXXMXY (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHPPT (SEQ ID NO:54).

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 13, где выделенное антитело или его фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19;

(c) VH, содержащего SEQ ID NO:12, и VL, содержащего SEQ ID NO:18; и/или

(d) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:13, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:19.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:33, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:34; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 36; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:58, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 15, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:14, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:20.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:38, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:60, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 17, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:15, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:21.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:62, (e) LC-CDR22, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 19, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:16, и VL, содержащего SEQ ID NO:22.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 47; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:63, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:64, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 21, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

- (a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17;
- (b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и/или
- (c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:17, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:23.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, как указано в любом из абзацев 11-22.

24. Экспрессирующая кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека по изобретению согласно абзацу 23.

25. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека по изобретению согласно абзацу 23 или абзацу 24.

26. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, включающий культивирование клетки согласно абзацу 25 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, и выделение указанного антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

27. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-22.

28. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-22

29. Набор для детекции наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер, и (b) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-22.

В. MAб, специфичные к профактору D:

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2) и не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3).

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1 или абзацу 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-3, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело представляет собой одноцепочечную молекулу.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает профактор D человека с K_D менее 10 нМ.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-8, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-9, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на подложке.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека согласно любому из абзацев 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 11, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 12, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XYWMS (SEQ ID NO:201), где X в положении 1

представляет собой N, S или T; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность EIRLKSXNYAXXYXESVKG (SEQ ID NO:202), где X в положении 7 представляет собой D или E, X в положении 11 представляет собой T или A, X в положении 12 представляет собой H или Y и X в положении 14 представляет собой A или T; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность AWFAX (SEQ ID NO:203), где X в положении 5 представляет собой S, Y или N; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSSQXLLYSXDQKNYLA (SEQ ID NO:204), где X в положении 1 представляет собой M или K, X в положении 5 представляет собой S или N, и X в положении 10 представляет собой K или R; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO:178);, и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность LQYYXYPYT (SEQ ID NO:205), где X в положении 5 представляет собой T или S.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 13, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:149 или SEQ ID NO:155, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:151 или SEQ ID NO:156; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:153; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:176, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:180.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 14, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:136;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:137;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:142;

(d) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:143;

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:136, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:142; и/или

(f) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:137, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:143.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 13, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:158, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:159 или SEQ ID NO:163; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:161 или SEQ ID NO:165; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:184 или SEQ ID NO:189, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3,

содержащая SEQ ID NO:187.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 16, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:138;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:139;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:144;

(d) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:145;

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:138, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:144; и/или

(f) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:139, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:145.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 11, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 18, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) CDR-H1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) CDR-H2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) CDR-H3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) CDR-L1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) CDR-L2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) CDR-L3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID NO:200.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 19, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:140;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:141;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:146;

(d) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:147;

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:140, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:146; и/или

(f) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:141, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:147.

21. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают профактор D человека как указано в любом из абзацев 11-20.

22. Экспрессирующая кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека согласно абзацу 21.

23. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека согласно абзацу 21 или абзацу 22.

24. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают профактор D человека, включающий культивирование клетки согласно абзацу 23 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека, и выделение указанного антитела, специфичного к указанному профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

25. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-20.

26. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-20.

27. Набор для детекции наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер, и (b) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, как указано в любом из абзацев 1-20.

С. Mab против фактора D (детекция профактора D и зрелого фактора D через связывание с общим эпитопом)

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-2, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-3, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечную молекулу.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором D человека с K_D менее 10 нМ.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-8, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на подложке.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека согласно любому из абзацев 1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99 (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из абзацев 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101 (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103 или 107 (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105 или 108, (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60 или 123; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119, 124 или 126, и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:121 или 125.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 10, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:85;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:86;

(c) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:87;

(d) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:88;

(e) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:89;

(f) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:90;

(g) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:91;

(h) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:92;

(i) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:93;

(j) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:85, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:89 или SEQ ID NO:90;

(k) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:86, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:91;

(l) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:87, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:92; и/или

(m) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:88, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:93.

14. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые

связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, как указано в любом из абзацев 10-13.

15. Экспрессирующая кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, согласно абзацу 14.

16. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают эпитоп, общий как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, согласно абзацу 14 или абзацу 15.

17. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D, включающий культивирование клетки согласно абзацу 16 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают фактор D человека, и выделение указанного антитела против фактора D или его антигенсвязывающего фрагмента.

18. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, как указано в любом из абзацев 1-13.

19. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, как указано в любом из абзацев 1-13.

20. Набор для детекции присутствия фактора D в биологическом образце, причем указанный набор содержит (а) по меньшей мере один контейнер и (б) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, как указано в любом из абзацев 1-13.

D. Наборы для детекции зрелого фактора D и/или профактора D в иммуноанализе

1. Набор, содержащий по меньшей мере одно моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически выявляют или количественно определяют зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и/или профактор D (SEQ ID NO:2) в иммуноанализе, где по меньшей мере одно моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(i) моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, охватывающим N-конец зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5) и где указанное антитело не связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2); или

(ii) моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4) и где указанное антитело не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3).

2. Набор согласно абзацу 1, где набор дополнительно содержит антитело или его фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), так и для профактора D человека (SEQ ID NO:2).

3. Набор согласно абзацу 1 или 2, где набор дополнительно содержит по меньшей мере один контейнер.

4. Набор согласно любому из абзацев 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (i), которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

5. Набор согласно любому из абзацев 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (ii), которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

6. Набор согласно любому из абзацев 1-5, где иммуноанализ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

7. Набор согласно любому из абзацев 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (i), представляет собой антитело покрытия.

8. Набор согласно любому из абзацев 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (i), представляет собой антитело детекции.

9. Набор согласно любому из абзацев 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (ii), представляет собой антитело покрытия.

10. Набор согласно любому из абзацев 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно абзацу 1, подраздел (ii), представляет собой антитело детекции.

11. Набор согласно любому из абзацев 1-10, где набор дополнительно содержит антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются

с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), так и для профактора D человека (SEQ ID NO:2).

12. Набор согласно абзацу 11, где антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

Е. Способы анализа для детекции зрелого фактора D

1. Способ определения наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, причем способ включает:

(а) приведение тестируемого образца в контакт с моноклональным антителом, специфичным к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающим фрагментом, в иммуноанализе *in vitro*; и

(б) детекцию наличия или отсутствия, или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество зрелого фактора D в образце;

где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D, указанном в качестве аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5).

2. Способ согласно абзацу 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и не связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2).

3. Способ согласно любому из абзацев 1 или 2, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.

4. Способ согласно любому из абзацев 1-3, где иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

5. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью и стадия (b) включает детекцию наличия или количества поддающейся детекции части.

6. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и детекцию наличия или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом, специфичным к зрелому фактору D.

7. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/покрытие) и детекцию связанного зрелого фактора D проводят с

использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D.

8. Способ согласно любому из абзацев 1-7, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего, например, где биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

9. Способ согласно любому из абзацев 1-8, где образец получают от млекопитающего, которое страдает от или имеет риск развития заболевания, обусловленного альтернативным путем.

10. Способ согласно любому из абзацев 1-9, где образец получают от млекопитающего после лечения ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 антитело.

11. Способ согласно любому из абзацев 1-10, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

12. Способ согласно любому из абзацев 1-11, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: а) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность X₁SX₂MGV₃S (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность H₁IYWDDEKHYX₂PSL₃KX (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность RY₁YGY₂XXX₃MX₄Y (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHNSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHPPT (SEQ ID NO:54).

13. Способ согласно любому из абзацев 1-11, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-

CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

Ф. Способы анализа для детекции профактора D

1. Способ определения наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем способ включает:

(a) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом, специфичным к профактору D человека, или его антигенсвязывающим фрагментом в иммуноанализе *in vitro*; и

(b) детекцию наличия или отсутствия, или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с профактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество профактора D в образце;

где антитело, специфичное к зрелому профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом в активационном ("про") пептиде фактора D человека, указанном как "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

2. Способ согласно абзацу 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2) и не связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3).

3. Способ согласно любому из абзацев 1 или 2, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.

4. Способ согласно любому из абзацев 1-3, где иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

5. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью и стадия (b) включает детекцию наличия или количества поддающейся детекции части.

6. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и наличие или количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом, специфичным к профактору D.

7. Способ согласно любому из абзацев 1-4, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/покрытие) и детекцию связанного профактора D проводят с использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D.

8. Способ согласно любому из абзацев 1-7, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего, например, где биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

9. Способ согласно любому из абзацев 1-8, где образец получают от млекопитающего, которое страдает от или имеет риск развития заболевания, обусловленного альтернативным путем.

10. Способ согласно любому из абзацев 1-9, где образец получают от млекопитающего после лечения ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 антитело.

11. Способ согласно любому из абзацев 1-10, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147.

12. Способ согласно любому из абзацев 1-11, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145.

13. Способ согласно любому из абзацев 1-11, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147.

14. Способ согласно любому из абзацев 1-11, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) CDR-H1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) CDR-H2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) CDR-H3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) CDR-L1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) CDR-L2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) CDR-L3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID NO:200.

Г. Способ оценки степени активации альтернативного пути в тестируемом образце

1. Способ оценки степени активации альтернативного пути комплемента (APC) в тестируемом образце, включающий:

(a) предоставление тестируемого образца;

(b) проведение иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из:

(i) захвата и детекции зрелого фактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция зрелого фактора D проводится с использованием моноклонального

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D; и/или

(ii) захвата и детекции профактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция профактора D проводится с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D; и

(c) сравнения уровня зрелого фактора D, детектированного в соответствии с (b)(i), с заданным уровнем или контрольным образцом и/или сравнения уровня профактора D, детектированного в соответствии с (b)(ii), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень зрелого фактора D и/или профактора D, детектированный в тестируемом образце, указывает на степень активации альтернативного пути комплемента.

2. Способ согласно абзацу 1, где стадия (b)(i) включает захват зрелого фактора D с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связывается с профактором D, и детекцию с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека.

3. Способ согласно абзацу 1, где стадия (b)(i) включает захват зрелого фактора D с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, и детекцию с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D.

4. Способ согласно абзацу 1, где стадия (b)(ii) включает захват профактора D с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D, и детекцию с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека.

5. Способ согласно абзацу 1, где стадия (b)(ii) включает захват профактора D с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, и детекцию с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D.

6. Способ согласно абзацу 1, где моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

7. Способ согласно абзацу 1, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

8. Способ согласно любому из абзацев 1-7, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего.

9. Способ согласно абзацу 8, где биологический образец включает цельную кровь, сыворотку, плазму, мочу или цереброспинальную жидкость.

10. Способ согласно любому из абзацев 1-9, где тестируемый образец содержит ингибитор комплемента, такой как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

11. Способ согласно абзацу 8, где млекопитающее лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 средство (например, ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

12. Способ согласно абзацу 8, где млекопитающим является человек.

13. Способ согласно абзацу 12, где человек страдает от, или имеет риск развития, или предположительно имеет заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем.

14. Способ согласно абзацу 13, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического

нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

15. Способ согласно любому из абзацев 11-14, где контрольный образец представляет собой образец, полученный от индивидуума до лечения ингибирующим MASP-3 средством, или образец, полученный в более ранний момент времени в ходе лечения ингибирующим MASP-3 средством.

16. Способ согласно любому из абзацев 11-15, где ингибирующее MASP-3 средство представляет собой ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Способ согласно абзацу 16, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и варибельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и варибельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTTHFPWT); или

(iv) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и варибельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID

NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

Н. Способы мониторинга эффективности лечения ингибирующим MASP-3 средством

1. Способ мониторинга эффективности лечения ингибирующим MASP-3 антителом у млекопитающего, причем способ включает:

(a) введение дозы ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему в первый момент времени;

(b) оценку первой концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (a);

(c) введение индивидууму ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента во второй момент времени;

(d) оценку второй концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (c); и

(e) сравнение уровня зрелого фактора D и/или профактора D, оцененного на стадии (b), с уровнем зрелого фактора D и/или профактора D, оцененным на стадии (d), для определения эффективности ингибирующего MASP-3 антитела у млекопитающего.

2. Способ согласно абзацу 1, где способ дополнительно включает коррекцию дозы ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

3. Способ согласно абзацу 2, где дозу ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента увеличивают, если уровень зрелого фактора D является более высоким, чем в случае контроля или эталонного стандарта.

4. Способ согласно абзацу 2, где дозу ингибирующего MASP-3 антитела или антигенсвязывающего фрагмента, вводимого индивидууму, увеличивают, если уровень профактора D является более низким, чем в случае контроля или эталонного стандарта.

5. Способ согласно абзацу 3 или 4, где, если индивидууму вводят увеличенную дозу ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, стадии (b)-(e) повторяют для определения того, является ли увеличенная доза достаточной для коррекции уровня зрелого фактора D и/или профактора D до желаемого уровня по сравнению с соответствующим контролем или эталонным стандартом.

6. Способ согласно любому из абзацев 1-5, где стадии (b) и (d) включают оценку концентрации зрелого фактора D в биологических образцах в иммуноанализе.

7. Способ согласно абзацу 6, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5), и не связываются с профактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или

количественного определения белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), но не белка профактора D (SEQ ID NO:2), которые могут присутствовать в биологическом образце.

8. Способ согласно любому из абзацев 1-5, где стадии (b) и (d) включают оценку концентрации профактора D в биологических образцах в иммуноанализе.

9. Способ согласно абзацу 8, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в пропептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот APPRGR (SEQ ID NO:4), и не связываются со зрелым фактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитела служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или количественного определения белка профактора D (SEQ ID NO:2), но не зрелого белка фактора D (SEQ ID NO:3), который может присутствовать в биологическом образце.

10. Способ согласно любому из абзацев 1-9, где млекопитающим является человек.

11. Способ согласно абзацу 10, где человек страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем.

12. Способ согласно абзацу 11, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

13. Способ согласно любому из абзацев 1-12, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

14. Способ согласно абзацу 13, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) переменная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) переменная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и переменная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTHTFPWT); или

(iv) переменная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

I. Способы лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем

1. Способ лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, включающий введение ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента индивидууму, если определено, что индивидуум имеет:

(i) более низкий или сниженный уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем D или по сравнению с уровнем профактора D в одном или нескольких контрольных образцах: и/или

(ii) более высокий или повышенный уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем зрелого фактора D или по сравнению с уровнем зрелого фактора D в одном или нескольких контрольных образцах.

2. Способ согласно абзацу 1, где уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа,

включающего применение моноклонального антитела, специфичного к профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

3. Способ согласно абзацу 2, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в пропептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот APPRGR (SEQ ID NO:4), и не связываются со зрелым фактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или их антигенсвязывающие фрагменты служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или количественного определения белка профактора D (SEQ ID NO:2), но не белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), которые могут присутствовать в образце.

4. Способ согласно абзацу 1, где уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа, включающего применение моноклонального антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

5. Способ согласно абзацу 4, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5), и не связываются с профактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или их антигенсвязывающие фрагменты служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции и количественного определения белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), но не белка профактора D (SEQ ID NO:2), которые могут присутствовать в образце.

6. Способ согласно любому из абзацев 1-5, где млекопитающим является человек.

7. Способ согласно любому из абзацев 1-6, где млекопитающее страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, выбранного из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР) или ассоциированную с трансплантацией ТМА), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной

волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

8. Способ согласно любому из абзацев 1-7, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

9. Способ согласно абзацу 8, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3, и содержит по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и варибельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и варибельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTTHFPWT); или

(iv) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и варибельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

Ж. Фармацевтические композиции и изделия

1. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в водном растворе, содержащем буферную систему, имеющую pH $6,0 \pm 5\%$, $20 \pm 5\%$ mM гистидин, $100 \pm 5\%$ мг/мл сахарозы и

0,035%±5%, полисорбата 80, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело включено в концентрации 110 мг/мл±5%, и где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

2. Фармацевтическая композиция согласно абзацу 1, где фармацевтическая композиция является стерильной.

3. Фармацевтическая композиция согласно абзацу 1 или 2, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:227, и переменную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:227.

4. Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев 1-3, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, антитела мыши и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных.

5. Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев 1-3, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и целого антитела.

6. Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев 1-3, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область иммуноглобулина.

7. Фармацевтическая композиция согласно абзацу 6, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека.

8. Фармацевтическая композиция согласно абзацу 7, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека с мутацией S228P.

9. Фармацевтическая композиция согласно абзацу 7 или 8, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию, которая способствует взаимодействиям FcRn при низких значениях pH.

10. Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев 7-9, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека, указанную под SEQ ID NO:245.

11. Изделие, содержащее фармацевтическую композицию согласно любому из абзацев 1-10.

12. Изделие согласно абзацу 11, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент находится в единичной дозированной форме от 10 мг до 1000 мг, пригодной для терапевтического введения человеку.

13. Изделие согласно абзацу 10 или 11, где изделие содержит контейнер и ярлык или вкладыш в упаковку на или прилагаемый к контейнеру.

14. Изделие согласно абзацу 13, где контейнер выбран из группы, состоящей из бутылки, ампулы, пакета (например, пакет для внутривенных инфузий), флакона, шприца и кассеты.

15. Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев 1-10 или изделие согласно любому из абзацев 11-14, где композиция и/или изделие предназначены для применения для лечения индивидуума, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем.

16. Фармацевтическая композиция или изделие согласно абзацу 15, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) или ассоциированную с трансплантацией ТМА), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA- васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

Следующие примеры только иллюстрируют наилучший способ, на данный момент предусматриваемый для применения изобретения на практике, однако они не должны быть истолкованы как ограничивающие изобретение.

Пример 1

В этом примере описано получение моноклональных антител, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека.

Справочные сведения:

В этом примере описано получение антител, специфичных к зрелому фактору D

человека, пригодных для применения в качестве реагентов для детекции для использования в способах анализа для определения наличия и/или количества зрелого фактора D в биологическом образце для применения в качестве биомаркера статуса APC. Антитела, описанные в этом примере, специфически связываются со зрелым фактором D человека (SEQ ID NO: 3), но не связываются с профактором D человека (SEQ ID NO:2).

Способы:

1. Экспрессия синтетического пептидного антигена зрелого фактора D

Аминокислотные последовательности полноразмерного фактора D человека (SEQ ID NO:1), профактора D человека (SEQ ID NO:2) и зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3) представлены на фиг.2. Как показано на фиг.2, пропептид профактора D представляет собой "APPRGR" (SEQ ID NO:4). На фиг.3 приведено выравнивание аминокислотных последовательностей фактора D комплемента (полноразмерный) из различных видов, включая Homo sapiens (SEQ ID NO:1); Macaca (SEQ ID NO:8); Canis (SEQ ID NO:9); Rattus (SEQ ID NO:10) и Mus (SEQ ID NO:11). Выделенная курсивом часть каждой последовательности обозначает сигнальную последовательность, а подчеркнутая часть обозначает последовательность активационного "про" пептида. Как показано на фиг.2 и 3, белок фактора D содержит активационный пептид (пропептид, подчеркнут). После отщепления пропептида зрелый фактор D имеет уникальный N-конец в каждом виде (например, имеет N-конец, начинающийся с остатка 26 полноразмерного фактора D человека (SEQ ID NO:1)) по сравнению с профактором D.

Для получения антител, специфичных к зрелому фактору D человека, получали синтетический пептид, соответствующий аминокислотным остаткам 26-32 фактора D комплемента человека: "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), следующим образом. Конъюгата синтетический зрелый пептид фактора D-KLH получали путем встраивания последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), отделенный спейсерной аминокислотной последовательностью от последовательности PADRE, спейсерную аминокислотную последовательность и С-концевой цистеин: "ILGGREAGPGPGAKFVAAAWTLKAAAKKC" (SEQ ID NO:6), позволяющий конъюгацию с KLH посредством химии присоединения с использованием сульфо-SMCC.

2. Иммунизация антигеном зрелого фактора D

Мышей C57BL6 иммунизировали конъюгатом синтетический пептид зрелого фактора D-KLH (SEQ ID NO:6), описанным выше. Мышей иммунизировали три раза подкожно посредством 50 мкл адъювантных эмульсий пептидного конъюгата (50-100 мкг общего белка на инъекцию).

Образцы сыворотки от иммунизированных мышей получали из ретроорбитального синуса и тестировали посредством ELISA в отношении присутствия антигенспецифических антител, способных связываться с иммобилизованным на планшете рекомбинантным профактором D человека (hPro-CFD) (SEQ ID NO:2) и рекомбинантным зрелым фактором D человека (hCFD) (SEQ ID NO:3), следующим образом:

Рекомбинантный про-CFD человека-His или рекомбинантный зрелый CFD человека-His иммобилизовывали на планшетах Maxisorp™ для ELISA в количестве 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем лунки планшета промывали три раза 300 мкл PBS, содержавшего 0,05% Tween 20 (PBST), блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре посредством 250 мкл PBS, содержавшего 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), и снова промывали. Сыворотку каждой мыши разбавляли PBST и позволяли связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали меченное пероксидазой хрена (HRP) антитело козы против Fc IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) (100 мкл/лунка), позволяли им связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали субстрат TMB (ThermoFischer) (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 1 N H₂SO₄ (50 мкл/лунка). Проводили считывание планшета в отношении оптической плотности при 450 нМ с использованием устройства для считывания планшетов Biotek™ ELISA.

Результаты:

На фиг.4 графически проиллюстрировано титрование сыворотки репрезентативной мыши #2 после иммунизации синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотным остаткам 26-32 фактора D комплемента человека "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), в присутствии рекомбинантного зрелого фактора D или рекомбинантного профактора D. Как показано на фиг.4, сыворотка репрезентативной мыши #2 содержит антитела, способные селективно связываться со зрелым фактором D относительно профактора D.

Мышей, демонстрировавших наиболее благоприятное связывание со зрелым фактором D и наименее благоприятное связывание с профактором D (т.е. мышь #2), отбирали для слияния гибридом. За трое суток до слияния мышам подкожно вводили 50 мкг mAb-агониста CD40 в PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) для увеличения количества В-клеток (см. Ruczyzn et al., Hybridoma 27:25-30, 2008). Мышей умерщвляли и клетки селезенки собирали и подвергали слиянию с выбранной миеломной клеточной линией мыши P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC № TIB18) с использованием 50% полиэтиленгликоля или 50% полиэтиленгликоля плюс 10% DMSO. Слияние приводило к получению гибридомных клеток, которые высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей Nunc, содержавшие среду с НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), для ингибирования пролиферации неслитых клеток, гибридов клеток миеломы и гибридов клеток селезенки. Лунки с гибридомными клетками подпитывали путем замены 80% среды свежей средой, содержавшей добавку НАТ. После селекции гибридом культуральные супернатанты анализировали в отношении связывания с рекомбинантным зрелым фактором D человека, как описано ниже.

3. Скрининг гибридом

Супернатанты гибридом сначала подвергали скринингу в отношении связывания с

иммобилизованным рекомбинантным зрелым фактором D человека с His. Было идентифицировано 10 гибридом (n=10), которые затем тестировали в отношении их способности детектировать рекомбинантный зрелый фактор D человека или рекомбинантный профактор D человека при захвате с использованием поликлонального антитела козы против фактора D человека AF1824 (R&D Systems) следующим образом. Планшеты для ELISA покрывали поликлональным антителом против фактора D человека AF1824 (R&D Systems). Супернатанты гибридом разбавляли в два раза PBS, 0,05% Tween 20 (PBST). Супернатант миеломной клеточной линии NS-1 (NS-1 sup) был включен в качестве контроля матрикса для определения фонового уровня в анализе.

На фиг.5 графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с захватом, в котором гибридомные супернатанты подвергали скринингу в отношении связывания со зрелым фактором D человека или профактором D человека при захвате с использованием поликлонального антитела против фактора D AF1824 (R&D Systems). Как показано на фиг.5, из 10 протестированных гибридом, супернатанты 8 гибридом (6G6, 14A11, 10G1, 27G8, 21D6, 27B3, 49G3, 58F5) продемонстрировали предпочтительное связывание с рекомбинантным зрелым фактором D человека по сравнению с рекомбинантным профактором D человека. Гибридомы 6G6, 14A11, 10G1, 27B3, 49G3 и 58GF5 были отобраны для клонирования ДНК и продуцирования рекомбинантного антитела.

Специфичность супернатантов гибридом

Специфичность супернатантов гибридом 14A11 и 6G6 далее анализировали путем детекции захваченных или эндогенных белков в матриксе в виде сыворотки или плазмы человека. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4°C поликлональным антителом козы против CFD человека AF1824 (R&D Systems). Лунки планшета промывали, блокировали и вновь промывали. Объединенную нормальную сыворотку человека, объединенную нормальную плазму человека или сыворотку человека с истощением фактора D разбавляли в 10 раз в буфере для анализа (PBS с 1% BSA и 0,05% Tween 20, PBST-BSA), либо без добавления, либо с добавлением 2 мкг/мл рекомбинантного профактора D (про-CFD) или зрелого фактора D (зрелый CFD). Эти матриксы, включая контроль в виде буфера с добавлением рекомбинантного белка или без него инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем промывали. Антитела детекции против фактора D человека разбавляли следующим образом, а затем вносили в планшет: подклоны супернатантов гибридом 6G6 и 14A11 разбавляли в два раза посредством PBST-BSA. Очищенное моноклональное антитело мыши mAb1824 разбавляли до 0,5 мкг/мл буфером PBST-BSA. Антитела для детекции ингибировали в течение одного часа при комнатной температуре и промывали, а затем проявляли меченым пероксидазой хрена (HRP) поликлональным антителом козы к Fc IgG мыши (Jackson ImmunoResearch).

Результаты:

Результаты представлены на фиг.6А-С. Следующие образцы #1-#8 представлены на каждой из фиг.6А-С:

- #1: контроль в виде сыворотки с истощением фактора D
- #2: сыворотка с истощением фактора D, в которую добавлен рекомбинантный зрелый CFD человека
- #3: сыворотка с истощением фактора D, в которую добавлен рекомбинантный про-CFD человека
- #4: контроль в виде нормальной сыворотки человека
- #5: контроль в виде нормальной плазмы человека
- #6: контроль в виде буфера
- #7: буфер с добавлением рекомбинантного зрелого CFD человека
- #8: буфер с добавлением рекомбинантного про CFD человека.

На фиг.6А графически иллюстрируются результаты для образцов #1-#8, описанных выше, в анализе ELISA с использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека 1824 и с детекцией с гибридным супернатантом 14A11, присутствующим в каждом из условий. Как показано на фиг.6А, гибридный супернатант 14A11 способен к селективной детекции рекомбинантного зрелого фактора D комплемента и не выявляет рекомбинантный профактор D. Следует отметить, что сигнал, полученный при добавлении к сыворотке Df-Dpl рекомбинантного зрелого CFD (#2), является сходным с сигналом, полученным при добавлении 10% нормальной сыворотки человека (#4) или нормальной плазмы человека (#5), обе из которых должны содержать нормальные уровни зрелого фактора D.

На фиг.6В графически иллюстрируются результаты для образцов #1-#8, описанных выше, в анализе ELISA с использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека 1824 и с детекцией с гибридным супернатантом 6G6, присутствующим в каждом из условий. Как показано на фиг.6В, гибридный супернатант 6G6 способен к селективной детекции рекомбинантного зрелого фактора D комплемента и не выявляет рекомбинантный профактор D. Следует отметить, что сигнал, полученный при добавлении к сыворотке Df-Dpl рекомбинантного зрелого CFD (#2), является сходным с сигналом, полученным при добавлении 10% нормальной сыворотки человека (#4) или нормальной плазмы человека (#5), обе из которых должны содержать нормальные уровни зрелого фактора D.

На фиг.6С графически иллюстрируются результаты для образцов #1-#8, описанных выше, в анализе ELISA с использованием покрытия с поликлональным антителом козы против CFD человека и с детекцией с моноклональным антителом mAb1824, присутствующим в каждом из условий. Как показано на фиг.6С, моноклональное антитело 1824 (R&D Systems) выявляет как рекомбинантный зрелый CFD, так и рекомбинантный активный CFD, и, таким образом, неспособно к селективной детекции зрелого CFD относительно про-CFD.

Супернатанты, демонстрирующие предпочтительное связывание со зрелой версией фактора D (т.е. 6G6, 14A11, 10G1, 27B3, 49G3 и 58GF5), подвергали и экспансии и клонировали посредством лимитирующих разведений до получения моноклональных

антител.

Пример 2

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности моноклональных антител, специфичных к зрелому фактору D человека.

Справочные сведения/обоснование:

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности антител, продуцированных гибридомами, демонстрирующими предпочтительное связывание со зрелой версией фактора D (т.е. клоны 6G6, 14A11, 10G1, 27B3, 49G3 и 58F5), которые были получены, как описано в примере 1.

Способы:

Клонирование и очистка рекомбинантных антител:

Положительные гибридомы 6G6, 14A11, 10G1, 27B3, 49G3, 58F5 получали и идентифицировали, как описано в примере 1. Эти гибридомы субклонировали способами серийных разведений. Варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали из гибридом, описанных в примере 1, с использованием ОТ-ПЦР и секвенировали. Кодирование антитела последовательности амплифицировали с тотальной РНК с использованием изотип-специфических обратных праймеров с использованием набора SMARTerTM RACE 5'/3' (Takara Bio). После подтверждения последовательностей варибельные (V) области вновь амплифицировали со сконструированными праймерами для клонирования и клонировали в экспрессирующие векторы, содержавшие либо константные области тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO:71) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:72) человека, либо константные области IgG2a (SEQ ID NO:218) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:219) мыши, с использованием набора для клонирования In-Fusion HDTM (Clontech). Экспрессирующие конструкции подвергали временной сотрансфекции в клетки Expi293 (Life Technologies) и после культивирования в течение 5 суток секретированные рекомбинантные антитела очищали из супернатантов посредством хроматографии с белком А.

Последовательности варибельных областей тяжелой цепи и варибельных областей легкой цепи представлены на фиг.7А и 7В, соответственно ("SIN"="SEQ ID NO:" на фиг.7А и фиг.7В), и включены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) каждой из них приведены в таблицах 7-10 ниже.

Последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела, специфичного к зрелому фактору D человека

На фиг.7А представлено выравнивание аминокислот последовательностей варибельной области тяжелой цепи (VH) для клонов, специфичных к зрелому фактору D человека: 6G6_VH (SEQ ID NO:12), 14A11_VH (SEQ ID NO:13), 27B3_VH (SEQ ID NO:14), 58F5_VH (SEQ ID NO:15), 49G3_VH (SEQ ID NO:16) и 10G1_VH (SEQ ID NO:17).

Ниже приведена последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) для каждого антитела, специфичного к зрелому фактору D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты.

6G6 VH: SEQ ID NO:12

QITLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGISLTTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DEKHYHPSLKSRLTISKDASRNQVFFRILSVDTADTATYYCALRYYGYRSFMDYWGQG
 TSVTVSS

14A11 VH: SEQ ID NO:13

QITLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGVSLTTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DEKHYHPSLKSRLTISKDASRNQVFFRILSVDTADTATYYCALRYYGYRSFMDYWGQG
 TSVTVSS

27B3 VH: SEQ ID NO:14

QVTLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGISLNISGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DEKHYNPSLKRRLTISKDASRNQVFFRILSVDSADTATYYCALRYYGYGSIMDYWGHGT
 SVTVSS

58F5 VH: SEQ ID NO:15

QVTLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGISLNTSIMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DEKHYNPSLKSRLTISKDASRNQVFLKIISVDTADTATYYCALRYYGYNYVMHYWGQG
 TSVTVSS

49G3 VH: SEQ ID NO:16

QVTLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGISLSSSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DEKHYNPSLKSRLTISKDASRNQIFLKIISVDTADTATYYCALRYYGYNYVMHYWGQGT
 SVTVSS

10G1 VH: SEQ ID NO:17

QVTLKESGPGILQSSQTL~~SLT~~CSFSGVSLSSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYW
DDEKHYNPSLKSRLTISKGASRNQVFLKIISVDTADTATYYCALRYYGYNSIMHYWGQG
 ASVTVSS

ТАБЛИЦА 7: последовательности VH антител, специфичных к зрелому фактору D человека (CDR и области FR, Kabat)

Антитело	FR1 HC	CDR1 HC
6G6	QITLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGISLT (SEQ ID NO:24)	TSGMGVS (SEQ ID NO:25)
14A11	QITLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGVSLT (SEQ ID NO:31)	TSGMGVS (SEQ ID NO:25)
27B3	QVTLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGISLN (SEQ ID NO:32)	ISGMGVSW (SEQ ID NO:33)
58F5	QVTLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGISLN (SEQ ID NO:32)	TSIMGVSW (SEQ ID NO:38)
49G3	QVTLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGISLS (SEQ ID NO:42)	SSGMGVSW (SEQ ID NO:43)
10G1	QVTLKESGPGILQSSQTL SLT CSFSGVSL (SEQ ID NO:42)	SSGMGVSW

	(SEQ ID NO:45)	(SEQ ID NO:43)
Антитело	FR2 HC	CDR2 HC
6G6	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYHPSLKS (SEQ ID NO:27)
14A11	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYHPSLKS (SEQ ID NO:27)
27B3	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYNPSLKR (SEQ ID NO:34)
58F5	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
49G3	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
10G1	WIRQPSGKGLEWLA (SEQ ID NO:26)	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
Антитело	FR3 HC	CDR3 HC
6G6	RLTISKDASRNQVFFRILSVDTADTATYY CAL (SEQ ID NO:28)	RYYGYRSFMDY (SEQ ID NO:29)
14A11	RLTISKDASRNQVFFRILSVDTADTATYY CAL (SEQ ID NO:28)	RYYGYRSFMDY (SEQ ID NO:29)
27B3	RLTISKDASRNQVFFRISSVDSADTATYY CAL (SEQ ID NO:35)	RYYGYGSIMDY (SEQ ID NO:36)
58F5	RLTISKDASRNQVFLKIISVDTADTATYY CAL (SEQ ID NO:40)	RYYGYNYVMHY (SEQ ID NO:41)
49G3	RLTISKDASRNQIFLKIISVDTADTATYYC AL (SEQ ID NO:44)	RYYGYNYVMHY (SEQ ID NO:41)
10G1	RLTISKGASRNQVFLKIISVDTADTATYY CAL	RYYGYNSIMHY (SEQ ID NO:47)

	(SEQ ID NO:46)	
Антитело	FR4 HC	
6G6	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
14A11	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
27B3	WGHGTSVTVSS (SEQ ID NO:37)	
58F5	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
49G3	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
10G1	WGQGASVTVSS (SEQ ID NO:48)	

Последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) антитела, специфичного к зрелому фактору D человека

На фиг.7B представлено выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи (VL) для клонов, специфичных к зрелому фактору D: 6G6_VK (SEQ ID NO:18), 14A11_VK: (SEQ ID NO:19), 27B3_VK: (SEQ ID NO:20), 58F5_VK: (SEQ ID NO:21), 49G3_VK: (SEQ ID NO:22), 10G1_VK: (SEQ ID NO:23).

Ниже приведена последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) для каждого антитела, специфичного к зрелому фактору D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми при нумерации как согласно системе Kabat, так и согласно системе Chothia.

6G6 VK: SEQ ID NO:18

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASIFCRSNQSIIVHSNGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

14A11 VK: SEQ ID NO:19

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASIFCRSNQSIIVHSNGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

27B3 VK: SEQ ID NO:20

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

58F5 VK: SEQ ID NO:21

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

49G3_VK: SEQ ID NO:22

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

10G1_VK: SEQ ID NO:23

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSESIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
YNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIKR

ТАБЛИЦА 8: Последовательности VL антител, специфичных к зрелому фактору D человека (CDR и области FR, Kabat и Chothia)

Антитело	FR1 LC	CDR1 LC
6G6	DVLMTQSPLSLPVSLGDQASIFC (SEQ ID NO:49)	RSNQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:50)
14A11	DVLMTQSPLSLPVSLGDQASIFC (SEQ ID NO:49)	RSNQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:50)
27B3	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:57)	RSSQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:58)
58F5	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:57)	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:60)
49G3	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:57)	RSSQSILHSNGNTYFE (SEQ ID NO:62)
10G1	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:57)	RSSESIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:63)
Антитело		
FR2 LC	CDR2 LC	
6G6	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
14A11	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
27B3	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
58F5	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
49G3	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
10G1	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	KVYNRFS (SEQ ID NO:64)

Антитело	FR3 LC	CDR3 LC
6G6	GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:53)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
14A11	GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYC (SEQ ID NO:56)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
27B3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:59)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
58F5	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYC (SEQ ID NO:61)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
49G3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:59)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
10G1	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:59)	FQGSHPPT (SEQ ID NO:54)
Антитело	FR4 LC	
6G6	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
14A11	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
27B3	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
58F5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
49G3	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
10G1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	

ТАБЛИЦА 9: Консенсусные последовательности CDR HC, специфичных к зрелому фактору D человека:

Антитело	Область	Последовательность
6G6	HC-CDR1	TSGMGVS (SEQ ID NO:25)
14A11	HC-CDR1	TSGMGVS (SEQ ID NO:25)
27B3	HC-CDR1	ISGMGVS (SEQ ID NO:33)

58F5	HC-CDR1	TSIMGVS (SEQ ID NO:38)
49G3	HC-CDR1	SSGMGVS (SEQ ID NO:43)
10G1	HC-CDR1	SSGMGVS (SEQ ID NO:43)
Консенсусная последовательность	HC-CDR1	XSXMGVS (SEQ ID NO:65) где X в положении 1 представляет собой T, I или S; X в положении 3 представляет собой G или I
6G6	HC-CDR2	HIYWDDEKHYHPSLKS (SEQ ID NO:27)
14A11	HC-CDR2	HIYWDDEKHYHPSLKS (SEQ ID NO:27)
27B3	HC-CDR2	HIYWDDEKHYNPSLKR (SEQ ID NO:34)
58F5	HC-CDR2	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
49G3	HC-CDR2	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
10G1	HC-CDR2	HIYWDDEKHYNPSLKS (SEQ ID NO:39)
Консенсусная последовательность	HC-CDR2	HIYWDDEKHYXPSLKX (SEQ ID NO:66) где X в положении 11 представляет собой H или N; X в положении 16 представляет собой S или R
6G6	HC-CDR3	RYYGYRSFMDY (SEQ ID NO:29)
14A11	HC-CDR3	RYYGYRSFMDY (SEQ ID NO:29)
27B3	HC-CDR3	RYYGYGSIMDY (SEQ ID NO:36)
58F5	HC-CDR3	RYYGYNYVMHY (SEQ ID NO:41)
49G3	HC-CDR3	RYYGYNYVMHY (SEQ ID NO:41)
10G1	HC-CDR3	RYYGYNSIMHY (SEQ ID NO:47)
Консенсусная последовательность	HC-CDR3	RYYGYXXXMXY (SEQ ID NO:67) где X в положении 6 представляет собой R, G или N; X в положении 7 представляет собой S или Y; X в положении 8 представляет собой F, I или V; X в положении 10 представляет собой D или H

ТАБЛИЦА 10: консенсусные последовательности CDR LC, специфичных к зрелому фактору D:

Антитело	Область	Последовательность
6G6	LC-CDR1	RSNQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:50)
14A11	LC-CDR1	RSNQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:50)
27B3	LC-CDR1	RSSQSIVHSNGNTYFE (SEQ ID NO:58)
58F5	LC-CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:60)
49G3	LC-CDR1	RSSQSILHSNGNTYFE (SEQ ID NO:62)
10G1	LC-CDR1	RSSESIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:63)
Консенсусная последовательность	LC-CDR1	RSXXSIXHSNGNTYXE (SEQ ID NO:68) где X в положении 3 представляет собой N или S; X в положении 4 представляет собой Q или E; X в положении 7 представляет собой V или L; X в положении 15 представляет собой F или L
6G6	LC-CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
14A11	LC-CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
27B3	LC-CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
58F5	LC-CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
49G3	LC-CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO:52)
10G1	LC-CDR2	KVYNRFS (SEQ ID NO:64)
Консенсусная последовательность	LC-CDR2	KVXNRFS (SEQ ID NO:69) где X в положении 3 представляет собой S или Y
6G6	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
14A11	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
27B3	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
58F5	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
49G3	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
10G1	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)
Консенсусная последовательность	LC-CDR3	FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54)

SEQ ID NO:70: константная область IgG4 человека:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:71: константная область IgG4 человека с мутацией S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:245: константная область IgG4 человека с мутацией S228P, а также с мутацией, которая способствует взаимодействиям FcRn при низких значениях pH

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:72: константная область IgK человека

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:218: константная область IgG2a мыши:

AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA
 VLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN
 LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHR
 EDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
 PPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL
 RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:219: константная область IgK человека:

ADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSW
 TDQDSKDESTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи mAb мыши, специфичного к зрелому фактору D человека:

SEQ ID NO:73: нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область HC 6G6

CAGATTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
 CAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGATTTCACTGACTACTTCTGGTATGGGTGTGAGC
 TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGCACACATTTATTGGGAT

GATGAGAAACACTATCATCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATGC
CTCCAGAAACCAGGTTTTCTTCAGGATCCTTAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCAC
ATACTACTGTGCTCTCCGTTACTACGGTTATAGGTCTTTTATGGACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:74: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область HC 14A11

CAGATTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
CAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGGTTTCACTGACTACTTCTGGTATGGGTGTGAGC
TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGCACACATTTATTGGGAT
GATGAGAAACACTATCATCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATGC
CTCCAGAAACCAGGTTTTCTTCAGGATCCTTAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCAC
ATATTACTGTGCTCTCCGTTACTACGGTTATAGGTCTTTTATGGACTATTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:75: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область HC 27B3

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
CAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGATTTCACTGAATATTTCCGGTATGGGTGTGAGC
TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGAT
GATGAAAAACACTATAATCCATCCCTGAAGAGACGGCTCACTATCTCCAAGGATGC
CTCCAGAAACCAGGTTTTCTTCAGGATCAGTAGTGTGGACTCTGCAGATACTGCCAC
ATACTACTGTGCGCTCCGTTACTACGGTTATGGTTCTATTATGGACTATTGGGGTCAT
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:76: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область HC 58F5

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
CAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGATTTCAATTGAATACTTCTATTATGGGTGTGAGC
TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGAT
GATGAGAAACACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGACTCACAATCTCCAAGGATGC
CTCCAGAAACCAGGATTCCTCAAGATCATTAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCAC
ATACTACTGTGCTCTCCGTTACTACGGTTATAACTATGTTATGCACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:77: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область HC 49G3

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
CAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGATTTCACTGAGTTCTTCTGGTATGGGTGTGAGC
TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGAT
GATGAGAAACACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATGC
CTCCAGAAACCAGATATTCCTCAAGATCATTAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCAC
ATATTATTGTGCTCTCCGTTACTACGGTTATAACTATGTTATGCACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:78: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область HC 10G1

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCT
CAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGGTTTCACTGAGTTCTTCTGGTATGGGTGTGAGC

TGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGAT
 GATGAGAAACACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGGTGC
 CTCCAGAAACCAGGTCTTCCTCAAGATCATTAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCAC
 AATACTACTGTGCTCTCCGTTACTACGGTTATAACTCTATTATGCACTACTGGGGTCAA
 GGAGCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:79: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 6G6

GATGTTTTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTTTTGCAGATCTAATCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTCGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 GG

SEQ ID NO:80: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC
 14A11

GATGTTTTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTTTTGCAGATCTAATCAGAGCATTGTTTCATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTCGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 GG

SEQ ID NO:81: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 27B3

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTTTCATAGTAATGGAAATACCTA
 TTTTGAATGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAGGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC
 GG

SEQ ID NO:82: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 58F5

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGATGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 GG

SEQ ID NO:83: нуклеиновая кислота, кодирующая варибельную область LC 49G3

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA

AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTCTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTTGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 GG

SEQ ID NO:84: нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область LC 10G1
 GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTGAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGT
 TTACAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC
 GG

Пример 3

В этом примере описана функциональная охарактеризация рекомбинантных очищенных антител, специфичных к зрелому фактору D человека, в нескольких способах анализа *in vitro*.

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описана функциональная охарактеризация рекомбинантных моноклональных антител, специфичных к зрелому фактору D человека, которые были получены, как описано в примерах 1 и 2, в отношении связывания со зрелым фактором D человека и связывания с профактором D.

Способы:

Сэндвич-анализ ELISA

Очищенные рекомбинантные антитела, специфичные к зрелому фактору D человека: 6G6, 14A11, 10G1, 49G3, 27B3 и 58F5 (Fc IgG4 человека), которые были получены, как описано в примерах 1 и 2, тестировали в формате сэндвич-ELISA в качестве антител детекции. Рекомбинантный белок профактора D человека (SEQ ID NO:2), обозначаемый как "про", и рекомбинантный белок зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), обозначаемый как "зрелый", захватывали с использованием связанного с планшетом поликлонального антитела козы против CFD человека AF1824 (R&D systems). Очищенные рекомбинантные антитела 6G6, 14A11, 10G1, 49G3, 27B3 и 58F5, а также контрольный IgG4 человека, добавляли в промытый планшет и инкубировали. Для проявки в анализе использовали HRP-меченное противомышиное вторичное антитело, а затем субстрат ТМВ.

Результаты:

На фиг.8 графически проиллюстрирована детекция рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с многочисленными антителами-кандидатами, специфичными к зрелому фактору D человека. Как показано на фиг.8, было обнаружено,

что все протестированные очищенные антитела, а именно 6G6, 14A11, 10G1, 49G3, 27B3 и 58F5, являются специфичными к зрелой форме фактора D относительно профактора D в формате анализа ELISA.

Анализ аффинности

Аффинность антител-кандидатов в отношении зрелого фактора D человека относительно профактора D определяли следующим образом.

Константы ассоциации и диссоциации определяли посредством Octet ForteBio. Являющиеся кандидатами рекомбинантные IgG4-антитела человека 6G6, 14A11, 10G1, 49G3, 27B3 и 58F5 в концентрации 20 нМ загружали на сенсоры, направленные на антитела человека, и им позволяли ассоциировать и диссоциировать в течение периодов времени, составляющих 5 минут, с рекомбинантным зрелым фактором D человека (111 нМ) или рекомбинантным профактором D человека (111 нМ). Результаты представлены ниже в таблице 11.

ТАБЛИЦА 11: Аффинность являющихся кандидатами антител в отношении зрелого фактора D человека относительно профактора D человека

Антитело-кандидат	KD (M), зрелый фактор D	KD (M), профактор D
6G6	1,43E-08	NC
14A11	9,77E-09	NC
10G1	7,31E-10	NC
49G3	2,30E-09	NC
58F5	<1,0E-12	NC
27B3	2,41E-08	NC
пустой	NC	NC

NC=программное обеспечение устройства не смогло вычислить

Исходя из результатов, описанных в этом примере, антитела 6G6 и 14A11 были выбраны для дальнейшего анализа и разработки вследствие превосходной чувствительности и специфичности в отношении зрелого фактора D человека относительно профактора D человека.

Закключение:

Как описано в примерах 1-3, авторы изобретения получили моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, которые специфически связываются со зрелым фактором D и не связываются с профактором D. Как дополнительно описано в примерах 10-12, уровень зрелого фактора D коррелирует с активностью альтернативного пути, таким образом, зрелые моноклональные антитела, специфичные к фактору D, могут использоваться для измерения уровня зрелого фактора D в качестве суррогатного результата в диагностическом анализе для оценки уровня активации альтернативного пути у млекопитающего. Как дополнительно описано в настоящем описании в примере 12, моноклональные антитела, специфичные к зрелому фактору D, могут использоваться в качестве фармакодинамического (PD) показателя ингибирования MASP-3 у индивидуума,

которому вводили ингибитор MASP-3, который может использоваться для определения эффективного дозирования ингибитора MASP-3.

Пример 4:

В этом примере описано получение моноклональных антител, индуцированных против зрелого фактора D человека и отобранных по их способности к детекции как белка зрелого фактора D, так и белка профактора D (т.е. антитела, которые связываются с эпитопом фактора D, который является общим как для зрелого белка фактора D, так и для белка профактора D).

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описано получение антител против фактора D человека, способных связываться как с про-формой фактора D человека, так и со зрелой формой фактора D человека. Антитела, описанные в этом примере, связываются как с профактором D, так и со зрелым фактором D, и являются пригодными в качестве антител покрытия в анализе ELISA для оценки статуса фактора D в биологическом образце.

Способы:

Иммунизация антигеном зрелого фактора D

Мышей C57BL/6 с нокаутом MASP-1/3 иммунизировали рекомбинантным His-меченным белком зрелого фактора D человека. Мышей иммунизировали два раза подкожно 50 мкл адъювантных эмульсий белка (50-100 мкг общего белка на инъекцию). Образцы сыворотки от иммунизированных мышей получали посредством взятия крови из хвоста и тестировали посредством ELISA в отношении присутствия антигенспецифических антител, способных связываться с иммобилизованным на планшете рекомбинантным профактором D человека (SEQ ID NO:2) и рекомбинантным зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3), оба из которых были strep-мечеными, следующим образом.

Рекомбинантный Strep-меченный про-CFD человека или рекомбинантный Strep-меченный зрелый CFD человека иммобилизовывали на планшетах Maxisorp™ для ELISA в количестве 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка, в течение ночи при 4°C. Затем лунки планшета промывали три раза 300 мкл PBS, содержавшего 0,05% Tween 20 (PBST), блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре посредством 250 мкл PBS, содержавшего 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), и снова промывали. Сыворотку репрезентативной мыши #1189 разбавляли PBST и позволяли связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали HRP-меченное антитело козы против Fc IgG мыши (100 мкл/лунка), позволяли им связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали субстрат TMB (ThermoFischer) (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 1 Н H₂SO₄ (50 мкл/лунка). Проводили считывание планшета в отношении оптической плотности при 450 нМ с использованием устройства для считывания планшетов Biotek™ ELISA. Результаты для сыворотки репрезентативной мыши (мышь #1189) представлены на фиг.9.

Результаты:

На фиг.9 графически проиллюстрировано титрование сыворотки репрезентативной мыши #1189 после иммунизации зрелым фактором D человека в присутствии рекомбинантного зрелого фактора D или рекомбинантного профактора D. Как показано на фиг.9, сыворотка репрезентативной мыши #1189 содержит антитела, способные связываться как со зрелым фактором D, так и с профактором D. Исходя из этих результатов, мышь #1189 была выбрана для слияния гибридом, которое проводили следующим образом.

За четверо суток до слияния гибридом мыши #1189 подкожно проводили последнюю инъекцию 50 мкг общего белка в 50 мл. За трое суток до слияния мыши #1189 подкожно вводили 50 мкг mAb-агониста CD40 в PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) для увеличения количества В-клеток (см. Ruczyzn et al., Hybridoma 27:25-30, 2008). Мышь умерщвляли и клетки селезенки собирали и подвергали слиянию с выбранной миеломной клеточной линией мыши P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC № TIB18) с использованием 50% полиэтиленгликоля или 50% полиэтиленгликоля плюс 10% DMSO. Слияние приводило к получению гибридомных клеток, которые высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей Nunc, содержавшие среду с НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), для ингибирования пролиферации неслитых клеток, гибридов клеток миеломы и гибридов клеток селезенки. Лунки с гибридомными клетками подпитывали путем замены 80% среды свежей средой, содержавшей добавку НАТ.

После селекции гибридом культуральные супернатанты анализировали в отношении связывания с рекомбинантным профактором D и зрелым фактором D человека, как описано ниже.

Скрининг гибридом

Супернатанты гибридом сначала подвергали скринингу в отношении связывания с иммобилизованным рекомбинантным зрелым фактором D человека со стрептавидином. Было идентифицировано 54 гибридомы, которые затем тестировали в отношении их способности связываться с рекомбинантным профактором D человека со стрептавидином при захвате с использованием поликлонального антитела козы против фактора D человека AF1824 (R&D Systems) следующим образом. Супернатанты гибридом разбавляли в два раза в PBS, 0,05% Tween 20 (PBST). В качестве контроля был включен супернатант миеломной клеточной линии NS-1 (NS-1 sup). Планшеты для ELISA покрывали поликлональным антителом против фактора D человека AF1824. Из 54 протестированных гибридом супернатанты 5 гибридом (3C5, 30H2, 11H1, 12H10 и 7H2) продемонстрировали равную аффинность связывания рекомбинантным профактором D человека и рекомбинантным зрелым фактором D человека и были отобраны для клонирования ДНК и продуцирования рекомбинантных антител, как дополнительно описано в примере 5.

Пример 5:

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности антител против фактора D человека, которые связываются как с профактором D, так и со зрелым

фактором D.

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности антител, продуцированных гибридомами, отобранными по способности к детекции как белка зрелого фактора D, так и белка профактора D (т.е. клоны 3C5, 30H2, 11H1, 12H10 и 7H2, которые связываются с эпитопом фактора D, который является общим как для зрелого белка фактора D, так и для белка профактора D), которые были получены, как описано в примере 4.

Способы:

Клонирование и очистка рекомбинантных антител:

Клоны гибридом 3C5, 30H2, 11H1, 12H10 и 7H2 получали и отбирали по способности к детекции как белка зрелого фактора D, так и белка профактора D, как описано в примере 4. Эти гибридомы субклонировали способами серийных разведений. Варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали с использованием ОТ-ПЦР и секвенировали. Кодированные антителом последовательности амплифицировали с тотальной РНК с использованием изотип-специфических обратных праймеров с использованием набора SMARTer™ RACE 5'/3' (Takara Bio). После подтверждения последовательностей варибельные (V) области вновь амплифицировали со сконструированными праймерами для клонирования и клонировали в экспрессирующие векторы, содержавшие либо константные области тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO:71) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:72) человека, либо константные области IgG2a (SEQ ID NO:218) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:219) мыши, с использованием набора для клонирования In-Fusion HD™ (Clontech). Экспрессирующие конструкции подвергали временной сотрансфекции в клетки Expi293 (Life Technologies) и после культивирования в течение 5 суток секретированные рекомбинантные антитела очищали из супернатантов посредством хроматографии с белком А.

Последовательности варибельных областей тяжелой цепи и варибельных областей легкой цепи представлены на фиг.10A и 10B, соответственно ("SIN"="SEQ ID NO:" на фиг.10A и фиг.10B), и включены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) каждой из них приведены в таблицах 12-13 ниже.

Варибельные области тяжелой цепи антитела против фактора D (С-конец) человека

На фиг.10A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелой цепи (VH) для клонов против фактора D человека: 3C5_VH (SEQ ID NO:85), 30H2_VH (SEQ ID NO:85), 11H1_VH (SEQ ID NO:86), 12H10_VH (SEQ ID NO:87) и 7H2_VH (SEQ ID NO:88).

Ниже представлена последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) для каждого антитела против фактора D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты.

3C5_VH: SEQ ID NO:85

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISN
LAYSFYVVDIVMGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARVGLYGNFFMDYW
 GQGTSVTVSS

30H2_VH: SEQ ID NO:85

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISN
LAYSFYVVDIVMGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARVGLYGNFFMDYW
 GQGTSVTVSS

11H1_VH: SEQ ID NO:86

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KSNNYATHYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQGYWYFDV
 WGTGTTVTVSS

12H10_VH: SEQ ID NO:87

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGYWYFDV
 WGTGTTVTVSS

7H2_VH: SEQ ID NO:88

EVQVVESGGGLVRPKGSLKLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLSLQMNNLKTEDTAMYYCVRQGYWYFDV
 WGTGTTVTVSS

ТАБЛИЦА 12: последовательности VH антитела против фактора D (С-конец)
 человека (CDR и области FR, Kabat)

Антитело	FR1 HC	CDR1 HC
3C5	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFS (SEQ ID NO:94)	DYGMA (SEQ ID NO:95)
30H2	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFS (SEQ ID NO:94)	DYGMA (SEQ ID NO:95)
11H1	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFN (SEQ ID NO:100)	TYAMN (SEQ ID NO:101)
12H10	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFN (SEQ ID NO:100)	TYAMN (SEQ ID NO:101)
7H2	EVQVVESGGGLVRPKGSLKLSCAASGFSFN (SEQ ID NO:109)	TYAMN (SEQ ID NO:101)
Антитело	FR2 HC	CDR2 HC
3C5	WVRQAPGKGPEWVA (SEQ ID NO:96)	FISNLAYSFYVVDIVMG (SEQ ID NO:97)
30H2	WVRQAPGKGPEWVA	FISNLAYSFYVVDIVMG

	(SEQ ID NO:96)	(SEQ ID NO:97)
11H1	WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:102)	RIRSKSNNYATHYADSV KD (SEQ ID NO:103)
12H10	WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:102)	RIRSKSNNYATYYADSV KD (SEQ ID NO:107)
7H2	WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:102)	RIRSKSNNYATYYADSV KD (SEQ ID NO:107)
Антитело FR3 HC CDR3 HC		
3C5	RFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYC AR (SEQ ID NO:98)	VGLYGNFFMDY (SEQ ID NO:99)
30H2	RFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYC AR (SEQ ID NO:98)	VGLYGNFFMDY (SEQ ID NO:99)
11H1	RFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDTAMYYC VR (SEQ ID NO:104)	QGYWYFDV (SEQ ID NO:105)
12H10	RFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDTAMYYC VR (SEQ ID NO:104)	HGYWYFDV (SEQ ID NO:108)
7H2	RFTISRDDSESMLSLQMNNLKTEDTAMYYC VR (SEQ ID NO:246)	QGYWYFDV (SEQ ID NO:105)
Антитело FR4 HC		
3C5	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
30H2	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:30)	
11H1	WGTGTTVTVSS	

	(SEQ ID NO:106)	
12H10	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:106)	
7H2	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:106)	

Вариабельные области легкой цепи антитела против фактора D человека:

На **фиг.10B** представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи (VL) для клонов против фактора D человека: 3C5_VL (SEQ ID NO:89), 30H2_VL (SEQ ID NO:90), 11H1_VL (SEQ ID NO:91), 12H10_VL (SEQ ID NO:92) и 7H2_VL (SEQ ID NO:93).

Ниже представлены последовательности переменной области легкой цепи (VL) для антител против фактора D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми при нумерации как согласно системе Kabat, так и согласно системе Chothia.

3C5 VL: SEQ ID NO:89

DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPPELLIYKASNLHT
GVPSRFSGNRSGTSFTLTISLQPEDIGTYFCQOGQSYPLTFGAGTKLELRR

30H2 VL: SEQ ID NO:90

DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPPELLIYKASNLHT
GVPSRFSGNRSGTSFTLTISLQPEDIGTYFCQOGQSYPLTFGAGTKLEIKR

11H1 VL: SEQ ID NO:91

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTV
SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKR

12H10 VL: SEQ ID NO:92

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYR
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKR

7H2 VL: SEQ ID NO:93

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTV
SNRFSGVDPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKR

ТАБЛИЦА 13: последовательности VL антитела против фактора D (С-конец) человека (CDR и области FR, Kabat и Chothia)

Антитело	FR1 LC	CDR1 LC
3C5	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC (SEQ ID NO:110)	HASQNINVWLS (SEQ ID NO:111)
30H2	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC (SEQ ID NO:110)	HASQNINVWLS (SEQ ID NO:111)
11H1	DVLMQTPLSLPVS LGDQASISC (SEQ ID NO:118)	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:60)

12H10	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:118)	RSSQSIVHSDGNTYLE (SEQ ID NO:123)
7H2	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (SEQ ID NO:118)	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:60)
Антитело		
	FR2 LC	CDR2 LC
3C5	WYQQKPGNIPELLIY (SEQ ID NO:112)	KASNLHT (SEQ ID NO:113)
30H2	WYQQKPGNIPELLIY (SEQ ID NO:112)	KASNLHT (SEQ ID NO:113)
11H1	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	TVSNRFS (SEQ ID NO:119)
12H10	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	RVSNRFS (SEQ ID NO:124)
7H2	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:51)	TVSNRFS (SEQ ID NO:119)
Антитело		
	FR3 LC	CDR3 LC
3C5	GVPSRFSGNRSRGTSTFTLTISSLQPEDIGTYFC (SEQ ID NO:114)	QQGQSYPLT (SEQ ID NO:115)
30H2	GVPSRFSGNRSRGTSTFTLTISSLQPEDIGTYFC (SEQ ID NO:114)	QQGQSYPLT (SEQ ID NO:115)
11H1	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY C (SEQ ID NO:120)	FQGSHVPWT (SEQ ID NO:121)
12H10	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY C (SEQ ID NO:120)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO:125)
7H2	GVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY C (SEQ ID NO:126)	FQGSHVPWT (SEQ ID NO:121)
Антитело		
	FR4 LC	
3C5	FGAGTKLELRR	

	(SEQ ID NO:116)	
30H2	FGAGTKLEIKR (SEQ ID NO:117)	
11H1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:122)	
12H10	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:122)	
7H2	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:122)	

ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи антител мыши против фактора D человека (которые связываются как с профактором D, так и со зрелым фактором D):

SEQ ID NO:127:3C5_VH

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
TGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACGGAATGGCGTGGG
TTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCCTGAGTGGGTAGCATTATTAGTAATTTGGCAT
ATAGTTTCTACTATGTAGACATTGTGATGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGAGAATG
CCAAGAACACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATG
TATTACTGTGCAAGAGTGGGGCTCTATGGTAACTTTTTTATGGACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:127:30H2_VH

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
TGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACGGAATGGCGTGGG
TTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCCTGAGTGGGTAGCATTATTAGTAATTTGGCAT
ATAGTTTCTACTATGTAGACATTGTGATGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGAGAATG
CCAAGAACACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATG
TATTACTGTGCAAGAGTGGGGCTCTATGGTAACTTTTTTATGGACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:128: 11H1_VH

GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCAT
TGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTCAATACCTACGCCATGAACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGT
AATAATTATGCAACACATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTCCAGA
GATGATTCAGAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACAC
AGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGGTTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCAC
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:129: 12H10_VH

GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCAT
TGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTCAATACCTACGCCATGAACTGGG

TCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGT
 AATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTCCAGA
 GATGATTCAGAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACAC
 AGCCATGTATTACTGTGTGAGACATGGTTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCAC
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:130: 7H2_VH

GAGGTGCAGGTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCGGCCTAAAGGGTCAT
 TGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTCAATACCTACGCCATGAACTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGT
 AATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTCCAGA
 GATGATTCAGAAAGCATGCTCTCTCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACAC
 AGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGGTTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCAC
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:131: 3C5_VL

GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACAC
 AATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTAAGCTGGTACCA
 GCAGAAACCAGGAAATATTCCTGAACTTTTGATCTATAAGGCTTCCAACCTGACAC
 AGGCGTCCCTTCTAGGTTTAGTGGCAATAGATCTGGAACAAGTTTCACATTAACCAT
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGGCACTTACTTCTGTCAACAGGGTCAAAGTTA
 TCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGACGG

SEQ ID NO:132: 30H2_VL

GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACAC
 AATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTAAGCTGGTACCA
 GCAGAAACCAGGAAATATTCCTGAACTTTTGATCTATAAGGCTTCCAACCTGACAC
 AGGCGTCCCTTCTAGGTTTAGTGGCAATAGATCTGGAACAAGTTTCACATTAACCAT
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGGCACTTACTTCTGTCAACAGGGTCAAAGTTA
 TCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAACGG

SEQ ID NO:133: 11H1_VL

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
 CGG

SEQ ID NO:134: 12H10_VL

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTGATGGAAACACCTA
 TTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAGAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG

ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCGTACACGTTCCGGAGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
 CGG

SEQ ID NO:135: 7H2_VL

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
 TTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAGT
 TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCCGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
 TTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTT
 TCAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 GG

Титры связывания антител против фактора D человека

Рекомбинантные очищенные клоны моноклональных антител с Fc IgG2a 3C5, 30H2, 11H1, 12H10 и 7H2 анализировали в анализе связывания в отношении способности связываться со зрелым фактором D человека и профактором D человека следующим образом:

Антитела-кандидаты титровали, начиная со связывания 3 мкг/мл антитела с 1 мкг/мл иммобилизованного на планшете рекомбинантного белка зрелого фактора D человека с His или рекомбинантного белка профактора D человека с His. Детекцию связанных антител проводили с использованием меченного поликлонального антитела козы, специфичного к Fc IgG мыши (Jackson ImmunoResearch). Результаты для репрезентативных антител 3C5 и 12H10 представлены на фиг.11А и 11В, соответственно.

На фиг.11А графически проиллюстрировано связывание рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с антителом-кандидатом против фактора D человека 3C5, демонстрирующее, что антитело 3C5 связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D.

На фиг.11В графически проиллюстрировано связывание рекомбинантного профактора D человека или зрелого фактора D с антителом-кандидатом против фактора D человека 12H10, демонстрирующее, что антитело 12H10 связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D.

Пример 6:

В этом примере описана разработка анализа ELISA, способного к детекции наличия и количества зрелого фактора D в сыворотке человека и яванского макака.

Справочная информация/обоснование:

Очищенные рекомбинантные антитела получали против уникального N-концевого эпитопа "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующего как в зрелом факторе D человека, так и в зрелом факторе D яванского макака, как описано в примерах 1-3 настоящего описания. Как описано в примерах 4 и 5 настоящего описания, также получали очищенные рекомбинантные антитела против зрелого фактора D, которые были отобраны по способности к детекции как профактора D, так и зрелого фактора D (т.е. связываются с

эпитопом, общим для зрелой формы и про-форм фактора D), и было определено, что они являются пригодными для применения в иммуноанализе. В этом примере описан анализ нескольких репрезентативных антител против фактора D (3C5, 12H10 и другие) в качестве антител покрытия в комбинации с репрезентативным антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D человека, в анализе ELISA.

Способы:

1. Тестирование применения антител против фактора D человека 3C5, 11H1, 12H10 и 30H2 в качестве антител покрытия в анализе ELISA с детекцией с использованием mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека

Рекомбинантными очищенными антителами с Fc IgG4 человека против фактора D (3C5, 11H1, 12H10 и 30H2) покрывали планшеты для ELISA, и позволяли им захватывать рекомбинантный зрелый фактор D и профактор D человека и яванского макака (huMat CFD, cy Mat CFD, huProCFD и cyPro CFD). Также проводили захват в сыворотке человека с истощением фактора D (сыворотка CFD Dpl) и образце объединенной нормальной плазмы яванского макака (NCP). Детекцию захваченного фактора D проводили с использованием версии Fc IgG2a мыши mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека. HRP-меченный F(ab')₂-фрагмент антитела ослика против IgG мыши H&L (Jackson ImmunoResearch) использовали для получения сигнала от антитела детекции с последующей проявкой посредством субстрата TMB (ThermoFisher).

Результаты анализа ELISA с репрезентативными антителами 3C5 и 12H10 представлены на фиг.12A и 12B, соответственно.

Результаты:

На фиг.12A графически иллюстрируются результаты анализа ELISA, в котором рекомбинантным антителом против фактора D 3C5 покрывали планшет для ELISA, и позволяли ему захватывать рекомбинантный зрелый фактор D и профактор D человека и яванского макака (huMat CFD, cy Mat CFD, huProCFD и cyPro CFD). Также проводился захват для сыворотки с истощенным фактором D (сыворотка CFD Dpl) и образца объединенной нормальной плазмы яванского макака (NCP). Детекцию захваченного фактора D проводили с версией Fc IgG2a для mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека.

На фиг.12B графически иллюстрируются результаты анализа ELISA, в котором рекомбинантным антителом против фактора D 12H10 покрывали планшет для ELISA, и позволяли ему захватывать рекомбинантный зрелый фактор D и профактор D человека и яванского макака (huMat CFD, cy Mat CFD, huProCFD и cyPro CFD). Также проводился захват для сыворотки с истощенным фактором D (сыворотка CFD Dpl) и образца объединенной нормальной плазмы яванского макака (NCP). Детекцию захваченного фактора D проводили с версией Fc IgG2a для mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека.

Как показано на фиг.12A и 12B, оба из антител против фактора D 3C5 и 12H10 являются пригодными для применения в качестве антител покрытия в комбинации с

антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D человека, в анализе ELISA для детекции зрелого фактора D в плазме человека и яванского макака.

2. Анализ ELISA для детекции зрелого фактора D с использованием комбинации антитела покрытия 3C5 (против фактора D человека/яванского макака) и антитела детекции 14A11 (специфичное к зрелому фактору D человека/яванского макака)

Способы:

Рекомбинантным очищенным антителом 3C5 с Fc IgG4 человека покрывали планшет для ELISA, и его тестировали со следующими образцами (3-кратные серийные разведения):

#1: рекомбинантный зрелый фактор D яванского макака (су Mat CFD, от 1 мкг/мл до 1,4 пг/мл)

#2: рекомбинантный зрелый фактор D человека (hu Mat CFD от 1 мкг/мл до 1,4 пг/мл)

#3: рекомбинантный профактор D яванского макака (су Pro CFD от 1 мкг/мл до 1,4 пг/мл)

#4: рекомбинантный профактор D человека (hu Pro CFD от 1 мкг/мл до 1,4 пг/мл)

#5: очищенный (из плазмы человека) фактор D человека (CFD) (от 1 мкг/мл до 1,4 пг/мл)

#6: сыворотка с истощением фактора D человека (сыворотка CFD-Dpl, от 50% до 0,07%)

#7: нормальная сыворотка человека (NHS, от 50% до 0,07%)

#8: сыворотка от пациента-человека с ЗМС (ЗМС, от 25% до 0,03%).

Детекцию захваченного фактора D проводили с использованием версии Fc IgG2a мыши mAb 14A11, специфичного к зрелому фактору D человека. HRP-меченный F(ab')₂-фрагмент антитела осла против IgG мыши H&L (Jackson ImmunoResearch) использовали для получения сигнала от антитела детекции с последующей проявкой посредством субстрата TMB (ThermoFisher).

Планшеты для микротитрования для ELISA (Maxisorb, Nunc) покрывали антителом клона 3C5 в концентрации 3 мкг/мл с использованием буфера покрытия (PBS: 1,06 мМ фосфат калия одноосновный KH_2PO_4 , 155 мМ хлорид натрия NaCl , 8,97 мМ фосфат натрия двухосновный $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4 (ThermoFisher). Планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующие сутки планшет промывали 3 раза буфером PBS с 0,05% и Tween20 (PBST). Остаточные участки связывания белка блокировали добавлением 250 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBST (PBST-BSA) в каждую лунку планшета и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты промывали три раза буфером PBST. В планшеты добавляли 3-кратные серийные разведения образцов #1-6 в диапазоне концентраций, показанном выше, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Затем лунки промывали три раза. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл клона антитела 14A11 (разбавленного до 3 мкг/мл в PBST-BSA) и инкубировали в течение одного часа при комнатной

температуре. Планшеты промывали три раза. В каждую лунку добавляли 100 мкл меченого пероксидазой хрена антитела в виде F(ab')₂-фрагмента ослы против IgG мыши H&L (Jackson ImmunoResearch), разбавленного 1:30000, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Затем лунки промывали три раза. Затем добавляли 100 мкл раствора субстрата ТМВ комнатной температуры (ThermoFisher) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Добавляли 50 мкл 1 Н H₂SO₄ для остановки реакции. Поглощение определяли при 450 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов ELISA Biotek Synergy HT.

Результаты:

На фиг.13 графически иллюстрируется детекция зрелого фактора D и профактора D человека и яванского макака посредством комбинации антитела захвата 3C5 (против фактора D человека/яванского макака) и антитела детекции 14A11 (специфичное к зрелому фактору D человека/яванского макака) в анализе ELISA. Как показано на фиг.13, связывание рекомбинантного зрелого фактора D человека (hu Mat CFD), нормальной сыворотки человека (NHS) и очищенного фактора D комплемента человека (hu purif. CFD, Complement Technologies) значительно превышало связывание рекомбинантного профактора D человека и яванского макака (hu pro CFD, sy Pro CFD), а также связывание в плазме пациента с синдромом ЗМС (ЗМС). Сыворотка с истощением фактора D человека (сыворотка CFD-Dpl) не имела связывания. Рекомбинантный зрелый фактор D яванского макака (sy Mat CFD) и нормальная плазма яванского макака (NCP) дали менее надежные результаты, чем их человеческие аналоги.

Пример 7

В этом примере описано получение моноклональных антител, которые специфически связываются с профактором D человека.

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описано получение антител, специфичных к профактору D человека. Антитела, описанные в этом примере, специфически связываются с профактором D человека и не связываются со зрелым фактором D человека.

Способы:

1. Конструирование антигена профактора D

Как показано на фиг.2 и 3, пропептид фактора D человека представляет собой "APPRGR" (SEQ ID NO:4), что соответствует остаткам 20-25 полноразмерного фактора D человека. Получали синтетический пептид-KLN, содержащий аминокислоты 20-25 фактора D комплемента человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4) с добавлением С-концевого цистеина, позволяющего конъюгацию с KLN посредством химии присоединения с использованием сульфо-SMCC.

1. Иммунизация антигеном профактора D

Мышей BALB/c иммунизировали конъюгатом синтетический пептид-KLN, содержащим аминокислоты 20-25 фактора D комплемента человека "APPRGR" (SEQ ID NO:4), с добавлением С-концевого цистеина, позволяющего конъюгацию с KLN

посредством химии присоединения с использованием сульфо-SMCC. Мышей иммунизировали четыре раза подкожно с 100-200 мкл адьювантных эмульсий пептидного конъюгата (50-100 мкг общего белка на инъекцию).

Образцы сыворотки от иммунизированных мышей получали из ретроорбитального синуса и тестировали посредством ELISA в отношении присутствия антигенспецифических антител, способных связываться с иммобилизованным на планшете рекомбинантным профактором D человека (SEQ ID NO:2) и рекомбинантным зрелым фактором D человека (SEQ ID NO:3), следующим образом:

Рекомбинантный про-CFD человека-His или рекомбинантный зрелый CFD человека-His иммобилизовывали на планшетах Maxisorp™ для ELISA в количестве 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем лунки планшета промывали три раза 300 мкл PBS, содержавшего 0,05% Tween 20 (PBST), блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре посредством 250 мкл PBS, содержавшего 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), и снова промывали. Сыворотку каждой мыши разбавляли PBST и позволяли связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали меченное HRP антитело козы против Fc IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) (100 мкл/лунка), позволяли им связываться в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Затем использовали субстрат TMB (ThermoFischer) (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 1 Н H₂SO₄ (50 мкл/лунка). Проводили считывание планшета в отношении оптической плотности при 450 нМ с использованием устройства для считывания планшетов Biotek™ ELISA.

На фиг.14 графически иллюстрируется титрование сыворотки репрезентативной мыши #2 после иммунизации синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотным остаткам 20-25 фактора D комплемента человека в присутствии рекомбинантного зрелого фактора D (hu зрелый CFD) или рекомбинантного профактора D (hu про-CFD). Как показано на фиг.14, сыворотка репрезентативной мыши #2 содержит антитела, способные селективно связываться со зрелым фактором D относительно профактора D, как описано в примере 7.

Мышей, демонстрировавших наиболее благоприятное связывание с профактором D и наименее благоприятное связывание со зрелым фактором D (т.е. мышь #2), отбирали для слияния гибридом. За трое суток до слияния мышам подкожно вводили 50 мкг mAb-агониста CD40 в PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) для увеличения количества В-клеток (см. Ruzczyn et al., Hybridoma 27:25-30, 2008). Мышей умерщвляли и клетки селезенки собирали и подвергали слиянию с выбранной миеломной клеточной линией мыши P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC № TIB18) с использованием 50% полиэтиленгликоля или 50% полиэтиленгликоля плюс 10% DMSO. Слияние приводило к получению гибридомных клеток, которые высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей Nunc, содержавшие среду с НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), для

ингибирования пролиферации неслитых клеток, гибридов клеток миеломы и гибридов клеток селезенки. Лунки с гибридными клетками подпитывали путем замены 80% среды свежей средой, содержащей добавку НАТ. После селекции гибридом культуральные супернатанты анализировали в отношении связывания с рекомбинантным профактором D и зрелым фактором человека, как описано ниже.

2. Скрининг гибридом

Супернатанты гибридом сначала подвергали скринингу в отношении связывания с иммобилизованным рекомбинантным профактором D человека. Затем гибридомы с положительным результатом тестирования посредством ELISA в отношении связывания с иммобилизованным рекомбинантным профактором D человека-His (n=6) (1F9, 2A4, 13A10, 18F5, 20A1, 21H1) тестировали в отношении связывания с рекомбинантным зрелым фактором D человека.

Специфичность гибридом против про-CFD человека далее анализировали следующим образом. Супернатанты гибридом (18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1) тестировали в отношении их способности к детекции рекомбинантного профактора D или зрелого фактора D при захвате посредством поликлонального антитела козы против фактора D человека AF1824 (R&D Systems) следующим образом. Планшеты для ELISA покрывали поликлональным антителом против фактора D человека AF1824 (R&D Systems). Супернатанты гибридом разбавляли в два раза PBS, 0,05% Tween 20 (PBST). Контрольные образцы включали: контрольный супернатант гибридомы, известной наличием связывания с MASP3 человека (aM3 35C1), разбавленный сходным образом. Контрольные образцы также включали: PBST, 1 мкг/мл IgG мыши (Jackson ImmunoResearch 015-000-003) и 1 мкг/мл моноклонального антитела мыши против CFD человека (R&D Systems MAB1824). Супернатантам гибридом и контрольным образцам позволяли связываться с захваченным профактором D или зрелым фактором D в течение одного часа при комнатной температуре. После промывания три раза посредством PBST добавляли 100 мкл/лунка вторичного антитела козы против Fc-гамма IgG мыши с HRP (Jackson ImmunoResearch), разбавленного в PBST, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания три раза PBST добавляли субстрат TMB (ThermoFisher), 100 мкл/лунка. Через 4 минуты реакцию останавливали посредством 50 мкл/лунка 1 N H₂SO₄, а затем проводили считывание при 450 нм на устройстве для считывания планшетов ELISA Biotek™.

На фиг.15 графически иллюстрируются результаты анализа ELISA с захватом, в котором проводился скрининг гибридных супернатантов в отношении связывания с профактором D человека или зрелым фактором D человека при захвате с использованием поликлонального антитела против фактора D AF1824 (R&D Systems).

Как показано на фиг.15, из 6 протестированных гибридом супернатанты всех 6 гибридом (18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1) продемонстрировали предпочтительное связывание с рекомбинантным профактором D человека по сравнению с рекомбинантным зрелым фактором D человека.

Гибридомы 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1 были отобраны для клонирования ДНК и продуцирования рекомбинантных антител.

Пример 8

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности моноклональных антител, специфичных к профактору D человека.

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описано клонирование и анализ последовательности антител, продуцированных гибридомами, демонстрирующими предпочтительное связывание с про-формой фактора D (т.е. 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1), описанных в примере 7.

Способы:

1. Клонирование и очистка рекомбинантных антител:

Положительные гибридомы 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1 получали и идентифицировали, как описано в примере 7. Эти гибридомы субклонировали способами серийных разведений.

Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали из гибридом 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10, 21H1 с использованием ОТ-ПЦР и секвенировали. Кодирующие антитело последовательности амплифицировали с тотальной РНК с использованием изотип-специфических обратных праймеров с использованием набора SMARTer™ RACE 5'/3' (Takara Bio). После подтверждения последовательностей переменные (V) области вновь амплифицировали со сконструированными праймерами для клонирования и клонировали в экспрессирующие векторы, содержавшие либо константные области тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO:71) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:72) человека, либо константные области IgG2a (SEQ ID NO:218) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:219) мыши, с использованием набора для клонирования In-Fusion HD™ (Clontech). Экспрессирующие конструкции подвергали временной сотрансфекции в клетки Expi293 (Life Technologies) и после культивирования в течение 5 суток секретированные рекомбинантные антитела очищали из супернатантов посредством хроматографии с белком А.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи представлены на фиг.16A и 16B, соответственно ("SIN"="SEQ ID NO:" на фиг.16A и фиг.16B), и включены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) каждой из них приведены в таблицах 13-16 ниже.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи (VH) антител, специфичных к профактору D человека

На фиг.16A представлено выравнивание аминокислот последовательностей переменной области тяжелой цепи (VH) для клонов, специфичных к профактору D человека: 18F5_VH (SEQ ID NO:136), 1F9_VH (SEQ ID NO:137), 2A4_VH (SEQ ID NO:138), 20A1_VH (SEQ ID NO:139), 13A10_VH (SEQ ID NO:140) и 21H1_VH (SEQ ID NO:141).

Ниже приведена последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) для каждого антитела, специфичного к профактору D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты.

18F5 VH: SEQ ID NO:136

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFGNYWMSWVRQSPEKGLEWVAEIRL
KSDNYATHYAESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRGEDTGLYYCTNAWFASWGQGT
LVTVSA

1F9 VH: SEQ ID NO:137

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFGSYWMSWVRQSPEKGLEWVAEIRL
KSDNYAAHYAESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRGEDTGIYYCTNAWFASWGQGT
LVTVSA

2A4 VH: SEQ ID NO:138

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSTYWMSWVRQSPEKGLEWVAEIRL
KSDNYATHYTESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRVEDTGIYYCTNAWFAYWGQGT
LVTVSA

20A1 VH: SEQ ID NO:139

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCIASGFTFSTYWMSWVRQSPEKGLEWVAEIRLK
SENATYYAESVKGKFIISRDDSKSRLYLQMNSLRAEDTGIYYCTNAWFANWGQGT
LVTVSA

13A10 VH: SEQ ID NO:140

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYI
GGIGYNPSLKSSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTGDTATYYCARNGAMDFWGQGISVTVSS

21H1 VH: SEQ ID NO:141

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISY
SGSTGYSPSLKSSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTGDTATYYCARNGAMDYWGQGISVTVS
S

ТАБЛИЦА 14: Последовательности VH антитела, специфичного к профактору D человека (CDR и области FR, Kabat)

Антитело	FR1 HC	CDR1 HC
18F5	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTF G (SEQ ID NO:148)	NYWMS (SEQ ID NO:149)
1F9	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTF G (SEQ ID NO:148)	SYWMS (SEQ ID NO:155)
2A4	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFS (SEQ ID NO:247)	TYWMS (SEQ ID NO:158)
20A1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCIASGFTFS	TYWMS

	(SEQ ID NO:162)	(SEQ ID NO:158)
13A10	DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT (SEQ ID NO:166)	SDYAWN (SEQ ID NO:167)
21H1	DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT (SEQ ID NO:166)	SDYAWN (SEQ ID NO:167)
Антитело	FR2 HC	CDR2 HC
18F5	WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:150)	EIRLKSDNYATHYAESVK G (SEQ ID NO:151)
1F9	WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:150)	EIRLKSDNYAAHYAESVK G (SEQ ID NO:156)
2A4	WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:150)	EIRLKSDNYATHYTESVK G (SEQ ID NO:159)
20A1	WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:150)	EIRLKSENYATYYAESVK G (SEQ ID NO:163)
13A10	WIRQFPGNKLEWVG (SEQ ID NO:168)	YISYIGGIGYNPSLKS (SEQ ID NO:169)
21H1	WIRQFPGNKLEWVG (SEQ ID NO:168)	YISYSGSTGYSPSLKS (SEQ ID NO:173)
Антитело	FR3 HC	CDR3 HC
18F5	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLRGEDTGLYYC TN (SEQ ID NO:152)	AWFAS (SEQ ID NO:153)
1F9	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLRGEDTGIYYC TN (SEQ ID NO:157)	AWFAS (SEQ ID NO:153)
2A4	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLRVEDTGIYYC TN (SEQ ID NO:160)	AWFAY (SEQ ID NO:161)

20A1	KFIISRDDSKSRLYLQMNSLRAEDTGIYYCT N (SEQ ID NO:164)	AWFAN (SEQ ID NO:165)
13A10	RISITRDTSKNQFFLHLNSVTTGDTATYYCA R (SEQ ID NO:170)	NGAMDF (SEQ ID NO:171)
21H1	RISITRDTSKNQFFLHLNSVTTGDTATYYCA R (SEQ ID NO:170)	NGAMDY (SEQ ID NO:174)
Антитело FR4 HC		
18F5	WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:154)	
1F9	WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:154)	
2A4	WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:154)	
20A1	WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:154)	
13A10	WGQGISVTVSS (SEQ ID NO:172)	
21H1	WGQGISVTVSS (SEQ ID NO:172)	

Последовательности варибельной области легкой цепи (VL) антитела, специфичного к профактору D человека

На фиг.16B представлено выравнивание аминокислот для последовательностей варибельной области легкой цепи (VL) для клонов, специфичных к профактору D человека: 18F5_VK (SEQ ID NO:142), 1F9_VK (SEQ ID NO:143), 2A4_VK (SEQ ID NO:144), 20A1_VK (SEQ ID NO:145), 13A10_VK (SEQ ID NO:146) и 21H1_VK (SEQ ID NO:147).

Ниже представлена последовательность варибельной области легкой цепи (VL) для каждого антитела, специфичного к профактору D человека. CDR согласно Kabat подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми при нумерации как посредством системы Kabat, так и посредством системы Chothia.

18F5 VL: SEQ ID NO:142

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCMSSQSLLYSKDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI

YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCLQYYTYPYTFGGGKLEIK
R

1F9 VL: SEQ ID NO:143

DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTMSCMSSQSLLYSKDQKNYLAWYQQKPGQSPTLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCLQYYTYPYTFGGGKLEIK
R

2A4 VL: SEQ ID NO:144

DIVMSQSPSSLA VSVGEKFTMSCKSSQSLLYSRDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKTEDLAVYYCLQYYSYPYTFGGGKLEIKR

20A1 VL: SEQ ID NO:145

DIVMSQSPSSLVSVGEKVTMSCKSSQNLLYSRDQKNYLAWYQQKPGQSPNLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISVKAEDLAVYYCLQYYSYPYTFGGGKLEMK
R

13A10 VL: SEQ ID NO:146

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYD
ASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEAPWTFGGGKLEIKR

21H1 VL: SEQ ID NO:147

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYD
ASTLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQNYEAPWTFGGGKLEIKR

ТАБЛИЦА 15: последовательности VL антитела, специфичного к профактору D человека (CDR и области FR, Kabat и Chothia)

Антитело	FR1 LC	CDR1 LC
18F5	DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSC (SEQ ID NO:175)	MSSQSLLYSKDQKNYL A (SEQ ID NO:176)
1F9	DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTMSC (SEQ ID NO:181)	MSSQSLLYSKDQKNYL A (SEQ ID NO:176)
2A4	DIVMSQSPSSLA VSVGEKFTMSC (SEQ ID NO:183)	KSSQSLLYSRDQKNYL A (SEQ ID NO:184)
20A1	DIVMSQSPSSLVSVGEKVTMSC (SEQ ID NO:188)	KSSQNLLYSRDQKNYL A (SEQ ID NO:189)
13A10	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO:193)	KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:194)
21H1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	KASQSVDYDGDSYMN

	(SEQ ID NO:193)	(SEQ ID NO:194)
Антитело	FR2 LC	CDR2 LC
18F5	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:177)	WASTRES (SEQ ID NO:178)
1F9	WYQQKPGQSPTLLIY (SEQ ID NO:182)	WASTRES (SEQ ID NO:178)
2A4	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:185)	WASTRES (SEQ ID NO:178)
20A1	WYQQKPGQSPNLLIY (SEQ ID NO:190)	WASTRES (SEQ ID NO:178)
13A10	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:195)	DASNLES (SEQ ID NO:196)
21H1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:195)	DASTLES (SEQ ID NO:199)
Антитело	FR3 LC	CDR3 LC
18F5	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYY C (SEQ ID NO:179)	LQYYTYPYT (SEQ ID NO:180)
1F9	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYY C (SEQ ID NO:179)	LQYYTYPYT (SEQ ID NO:180)
2A4	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKTEDLAVYY C (SEQ ID NO:186)	LQYYSYPYT (SEQ ID NO:187)
20A1	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYY C (SEQ ID NO:191)	LQYYSYPYT (SEQ ID NO:187)
13A10	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC (SEQ ID NO:197)	QQSNEAPWT (SEQ ID NO:198)
21H1	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC (SEQ ID NO:197)	QQNYEAPWT (SEQ ID NO:200)

Антитело	FR4 LC	
18F5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
1F9	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
2A4	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
20A1	FGGGTKLEMKR (SEQ ID NO:192)	
13A10	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	
21H1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:55)	

ТАБЛИЦА 16: консенсусные последовательности CDR HC, специфичных к профактору D человека:

Антитело	Область	Последовательность
18F5	HC-CDR1	NYWMS (SEQ ID NO:149)
1F9	HC-CDR1	SYWMS (SEQ ID NO:155)
2A4	HC-CDR1	TYWMS (SEQ ID NO:158)
20A1	HC-CDR1	TYWMS (SEQ ID NO:158)
Консенсусная последовательность	HC-CDR1	XYWMS (SEQ ID NO:201), где X в положении 1 представляет собой N, S или T
18F5	HC-CDR2	EIRLKSDNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:151)
1F9	HC-CDR2	EIRLKSDNYAAHYAESVKG (SEQ ID NO:156)
2A4	HC-CDR2	EIRLKSDNYATHYTESVKG (SEQ ID NO:159)
20A1	HC-CDR2	EIRLKSENYATYYAESVKG (SEQ ID NO:163)
Консенсусная последовательность	HC-CDR2	EIRLKSNYAXXYXESVKG (SEQ ID NO:202), где X в положении 7 представляет собой D или E; X в положении 11 представляет собой T или A; X в положении 12 представляет собой H или Y; X в положении 14 представляет собой A или T

18F5	HC-CDR3	AWFAS (SEQ ID NO:153)
1F9	HC-CDR3	AWFAS (SEQ ID NO:153)
2A4	HC-CDR3	AWFAY (SEQ ID NO:161)
20A1	HC-CDR3	AWFAN (SEQ ID NO:165)
Консенсусная последовательность	HC-CDR3	AWFAX (SEQ ID NO:203) где X в положении 5 представляет собой S, Y или N

ТАБЛИЦА 17: Консенсусные последовательности для CDR LC, специфичных к профактору D:

Антитело	Область	Последовательность
18F5	LC-CDR1	MSSQSLLYSKDQKNYLA (SEQ ID NO:176)
1F9	LC-CDR1	MSSQSLLYSKDQKNYLA (SEQ ID NO:176)
2A4	LC-CDR1	KSSQSLLYSRDQKNYLA (SEQ ID NO:184)
20A1	LC-CDR1	KSSQNLLYSRDQKNYLA (SEQ ID NO:189)
Консенсусная последовательность	LC-CDR1	XSSQXLLYSXDQKNYLA (SEQ ID NO:204) где: X в положении 1 представляет собой M или K; X в положении 5 представляет собой S или N; X в положении 10 представляет собой K или R
18F5	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
1F9	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
2A4	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
20A1	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
Консенсусная последовательность	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
18F5	LC-CDR3	LQYYTYPYT (SEQ ID NO:180)
1F9	LC-CDR3	LQYYTYPYT (SEQ ID NO:180)
2A4	LC-CDR3	LQYYSPYPT (SEQ ID NO:187)
20A1	LC-CDR3	LQYYSPYPT (SEQ ID NO:187)
Консенсусная	LC-CDR3	LQYYXYPYT (SEQ ID NO:205)

последовательность		где X в положении 5 представляет собой T или S
---------------------------	--	--

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела, специфичные к профактору D:

18F5 VH: SEQ ID NO:206

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGATCC
 ATGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTTACTTTTCGGTAACTACTGGATGTCTTGGG
 TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTG
 ATAATTATGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAAGTTCACCATCTCAAGA
 GATGATTCCAAAAGTCGTCTCTACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGGTGAAGACAC
 TGGACTTTATTACTGTACGAATGCCTGGTTTGCTTCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
 CACTGTCTCTGCA

1F9 VH: SEQ ID NO:207

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC
 ATGAAACTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTTACTTTTCGGTAGCTACTGGATGTCTTGGG
 TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTG
 ATAATTATGCAGCACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAAGTTCACCATCTCAAGA
 GATGATTCCAAAAGTCGTCTCTACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGGCGAAGACAC
 TGGAATTTATTACTGTACGAATGCCTGGTTTGCTTCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
 CACTGTTTCTGCA

2A4 VH: SEQ ID NO:208

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC
 ATGAAACTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTTACTTTTCAGCACTTATTGGATGTCTTGGG
 TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTG
 ATAATTATGCAACACATTATACGGAGTCTGTGAAAGGGAAGTTCACCATCTCAAGA
 GATGATTCCAAAAGTCGTCTCTACCTGCAAATGAACAGTTTAAGAGTTGAAGACACT
 GGAATTTATTATTGTACGAATGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC
 ACTGTCTCTGCA

20A1 VH: SEQ ID NO:209

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC
 ATGAAACTCTCCTGTATTGCCTCTGGATTTACTTTTCAGTACCTACTGGATGTCTTGGG
 TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTG
 AAAATTATGCAACATATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAAGTTCATCATCTCAAGA
 GATGATTCCAAAAGTCGTCTCTACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAAGACAC
 TGGAATTTATTACTGTACGAATGCCTGGTTTGCTAACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
 CACTGTCTCTGCA

13A10 VH: SEQ ID NO:210

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCT
 GTCCCTCACCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACCTG
 GATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACATTG
 GTGGCATTGGCTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAATCTCTACTCGAGACACAT

CCAAGAACCAGTTCTTCCTGCACTTGAATTCTGTGACTACTGGGGACACAGCCACAT
ATTACTGTGCAAGAAACGGGGCTATGGACTTCTGGGGTCAAGGAATCTCAGTCACC
GTCTCCTCA

21H1_VH: SEQ ID NO:211

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTCAAACCTTCTCAGTCTCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCAGTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAAGT
GATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTACAGTG
GTAGCACTGGCTATAGCCCATCTCTCAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACAT
CCAAGAACCAGTTCTTCCTGCACTTGAATTCTGTGACTACTGGAGACACAGCCACAT
ATTACTGTGCACGAAACGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAATCTCAGTCACC
GTCTCCTCA

18F5_VK: SEQ ID NO:212

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAA
GGTTACTATGAGCTGCATGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAAAGATCAAAGAA
CTACTTGGCCTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATTTACTG
GGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCTGCAATATTATACCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA
AAACGG

1F9_VK: SEQ ID NO:213

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAACTGTGTCAGTTGGAGAGAA
GGTTACTATGAGCTGCATGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAAAGATCAAAGAA
CTACTTGGCCTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATTTACTG
GGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCTGCAATATTATACCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA
AAACGG

2A4_VK: SEQ ID NO:214

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAA
GTTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTCGCGATCAAAGAA
CTACTTGGCCTGGTACCAGCAGCAACCAGGGCAGTCTCCTAACTTCTGATTTACTG
GGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGACTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCTCCAATATTATAGCTATCCGTACACTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA
AACGG

20A1_VK: SEQ ID NO:215

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGTTGTGTCAGTTGGAGAGAA
GGTTACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAGAACCTTTTATATAGTAGGGATCAAAGAA
CTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTTCTGATTTACTG
GGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGA

CAGATTTCTCTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCTCCAATATTATAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATG
AAACGG

13A10_VK: SEQ ID NO:216

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG
GGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATAT
GAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCAT
CCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAG
CAAAGTAATGAGGCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACG
G

21H1_VK: SEQ ID NO:217

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG
GGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATAT
GAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATTTATGATGCTTC
CACTCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCA
AAATTATGAGGCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

Пример 9

В этом примере описана функциональная охарактеризация рекомбинантных очищенных антител, специфичных к профактору D человека, в нескольких способах анализа *in vitro*.

Справочная информация/обоснование:

В этом примере описана функциональная охарактеризация рекомбинантных моноклональных антител, специфичных к профактору D человека, которые были получены, как описано в примерах 7 и 8, в отношении связывания с профактором D человека и связывания со зрелым фактором D человека.

Способы:

1. Очищенные рекомбинантные антитела: связывание с иммобилизованным профактором D и зрелым фактором D

Моноклональные антитела против про-CFD человека 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1 получали рекомбинантными способами на каркасе IgG4 человека, как описано в примере 8. Эти антитела продемонстрировали предпочтительное связывание посредством ELISA в качестве гибридных супернатантов на иммобилизованном рекомбинантном профакторе D человека (как описано в примере 7) и вновь тестировали в качестве рекомбинантных антител в отношении их способности связываться с иммобилизованным рекомбинантным зрелым фактором D человека или рекомбинантным профактором D человека, как описано ниже.

Очищенные рекомбинантные антитела 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1 подвергали серийному разведению в PBST от 3 мкг/мл с 3-кратными разведениями на

планшетах для ELISA, покрытых 1 мкг/мл рекомбинантного профактора D человека и зрелого фактора D и блокированных PBS, 1% BSA. Аналогично разбавляли и включали контрольные очищенные антитела: моноклональное антитело крысы против CFD мыши (R&D Systems MAB5430), моноклональное антитело мыши против CFD человека (R&D MAB18241), IgG крысы (Jackson ImmunoResearch 012-000-003) и IgG мыши (Jackson ImmunoResearch 015-000-003). После инкубации в течение 1 часа планшеты промывали, добавляли меченное HRP вторичное антитело против антител мыши, крысы или человека (Southern Biotech 9230-05) и инкубировали в течение одного часа с последующим промыванием, а затем добавляли субстрат TMB (ThermoFisher). Реакцию останавливали добавлением 1 N H₂SO₄, и проводили считывание при 450 нм на устройстве для считывания планшетов для ELISA Biotek™.

Результаты:

На фиг.17А графически проиллюстрирована детекция рекомбинантного профактора D человека с многочисленными антителами-кандидатами, специфичными к профактору D человека. Как показано на фиг.17А, все протестированные очищенные антитела, а именно: 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, были способны к детекции формы фактора D.

На фиг.17В графически иллюстрируется детекция рекомбинантного зрелого фактора D человека с использованием многочисленных антител-кандидатов, специфичных к профактору D человека. Как показано на фиг.17В, ни одно из протестированных очищенных антител, а именно, 18F5, 1F9, 2A4, 20A1, 13A10 и 21H1, не было способно к детекции зрелой формы фактора D. Контрольные образцы включали IgG крысы и IgG мыши, которые не связывали ни профактор D человека, ни зрелый фактор D человека. Было протестировано две формы коммерческих антител против фактора D, а именно, MAB5430 и MAB18241. Оба из этих коммерческих антител лишены специфичности в отношении как профактора D человека, так и зрелого фактора D человека.

2. Дальнейший анализ очищенного рекомбинантного антитела 21H1, специфичного к профактору D: специфичность и чувствительность

А. Детекция рекомбинантного профактора D человека и зрелого фактора D

Способы:

Очищенное рекомбинантное антитело 21H1, специфичное к профактору D (Fc IgG4 человека) тестировали в формате сэндвич-ELISA в качестве антитела захвата/покрытия. После инкубации в течение ночи, блокирования и промывания, рекомбинантный профактор D человека и зрелый фактор D разбавляли до 2 мкг/мл нормальной плазмы человека, а затем PBST-BSA. Контроль без дополнительного фактора D обрабатывали аналогичным образом. Анализируемые лунки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Детекцию захваченных молекул проводили с использованием 0,1 мкг/мл меченого биотином подвергнутого аффинной очистке поликлонального антитела козы, индуцированного против зрелого

фактора D человека (R&D BAF1824), в PBST-BSA. После инкубации и промывания добавляли HRP-меченный стрептавидин, инкубировали и промывали, а затем добавляли субстрат TMB (ThermoFisher). Результаты представлены на фиг. 18.

Результаты:

На фиг. 18 графически иллюстрируется детекция рекомбинантного профактора D и зрелого (активного) фактора D в анализе ELISA с использованием рекомбинантного антитела 21H1 против профактора D в качестве антитела покрытия и поликлонального антитела козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции. Как показано на фиг. 18, сигнал является более высоким в присутствии зрелого фактора D, чем в случае буфера или матрикса (без фактора D). MAб 21H1 продолжает обнаруживать профактор D при наиболее низкой протестированной концентрации (0,46 нг/мл), в то время как сигнал матрикса или зрелого фактора D соответствует фоновым уровням при 10 нг/мл. Эти результаты демонстрируют, что специфичность анализа является следствием антитела 21H1, специфичного к профактору D.

В. Анализ присутствия профактора D человека в сыворотке человека

Способы:

Очищенное рекомбинантное антитело 21H1, специфичное к профактору D (Fc IgG4 человека), тестировали в формате сэндвич-ELISA в качестве антитела покрытия/захвата. После инкубации в течение ночи 1 мкг/мл антитела 21H1 планшеты блокировали и промывали, и рекомбинантный профактор D человека (про-CFD) разбавляли до 1 мкг/мл в 50% нормальной плазме человека (NHP), 50% нормальной сыворотке человека (NHS) или 50% сыворотке с истощением фактора D (сыворотка Df-Dpl), а затем последовательно в PBST-BSA. Контроли без дополнительного фактора D в сыворотке обрабатывали аналогичным образом (без добавления). Анализируемые лунки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Детекцию захваченных молекул проводили с использованием 0,1 мкг/мл меченого биотином подвергнутого аффинной очистке поликлонального антитела козы, индуцированного против зрелого фактора D человека (R&D BAF1824) в PBST-BSA. После инкубации и промывания добавляли HRP-меченный стрептавидин, инкубировали и промывали, а затем добавляли субстрат TMB. Результаты представлены на фиг. 19.

Результаты:

На фиг. 19 графически проиллюстрировано количество профактора D, присутствующего в нормальной плазме человека (NHP), нормальной сыворотке человека (NHS) или сыворотке с истощением фактора D (сыворотка Df-Dpl) при определении в анализе ELISA с использованием антитела 21H1 против профактора D в качестве антитела покрытия и поликлонального антитела козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции. Как показано на фиг. 19, положительный сигнал возникает в результате добавления рекомбинантного профактора D к разбавителю, нормальной плазме человека, нормальной сыворотке человека или сыворотке с истощением фактора D. В нормальной плазме человека без добавления, нормальной сыворотке человека без

добавления или сыворотке с истощением фактора D без добавления сигнал является очень низким или отсутствует.

С. Анализ присутствия профактора D человека в тестируемых образцах сыворотки

Способы:

Очищенное рекомбинантное антитело 21H1, специфичное к профактору D (Fc IgG4 человека) тестировали в формате сэндвич-ELISA в качестве антитела покрытия/захвата с нормальной сывороткой человека (NHS, Complement Technologies), сывороткой с истощением C1q (C1q-Dpl, Complement Technologies A399), сывороткой с истощением фактора D (Df-Dpl, Complement Technologies FactorD-Dpl) и сывороткой пациента с синдромом ЗМС (пациент 3 с дефицитом активности MASP-3, любезно предоставленная Dr. Wilhelm Schwaeble). После инкубации в течение ночи 1 мкг/мл антитела 21H1 в PBS, блокирования и промывания сыворотки разбавляли 1:10 в PBST-BSA, а затем в 2 раза в PBST-BSA. Анализируемые лунки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали три раза PBST. Детекцию захваченных молекул проводили с использованием 0,1 мкг/мл меченого биотином подвергнутого аффинной очистке поликлонального антитела козы, индуцированного против зрелого фактора D человека (R&D BAF1824) в PBST-BSA. После инкубации и промывания добавляли HRP-меченный стрептавидин, инкубировали и промывали, а затем добавляли субстрат TMB (ThermoFisher).

Результаты:

На фиг.20 графически иллюстрируется количество профактора D в нормальной сыворотке человека (NHS), сыворотке с истощением C1q (C1q-Dpl), сыворотке с истощением фактора D (Df-Dpl) и сыворотке пациента с синдромом ЗМС при определении в анализе ELISA с антителом против профактора D 21H1 в качестве антитела покрытия и поликлональным антителом козы против фактора D AF1824 (R&D Systems) в качестве антитела детекции. В то время как нормальная сыворотка человека и сыворотка человека с истощением фактора D или C1q имеют очень низкий сигнал при разбавлении в 10 раз и более, детекция профактора D в сыворотке пациента с синдромом ЗМС является высокой.

Заключение:

Как описано в примерах 7-9, авторы изобретения получили моноклональные антитела, специфичные к профактору D, которые специфически связываются с профактором D и не связываются со зрелым фактором D. Как дополнительно описано в примерах 10-12, уровень профактора D коррелирует с активностью альтернативного пути, таким образом, моноклональные антитела, специфичные к профактору D, могут использоваться для измерения уровня профактора D в качестве суррогатного результата в диагностическом анализе для оценки уровня активации альтернативного пути у млекопитающего. Как дополнительно описано в настоящем описании в примере 12, моноклональные антитела, специфичные к профактору D, могут использоваться в качестве фармакодинамического (PD) показателя ингибирования MASP-3 у индивидуума,

которого лечат ингибитором MASP-3, который может использоваться для определения эффективной дозировки ингибитора MASP-3.

Пример 10:

В этом примере описано получение гуманизованных антител, которые связываются с MASP-3 и ингибируют созревание профактора D в фактор D и тем самым ингибируют альтернативный путь.

Справочная информация/обоснование:

Как показано на фиг.1 и описано в настоящем описании, было определено, что MASP-3 необходима для конвертирования профактора D в фактор D, таким образом, MASP-3 является ключевым регулятором альтернативного пути комплемента (APC). Были получены многочисленные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 моноклональные антитела, как описано в WO2018/026722, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Как дополнительно описано в WO2018/026722, несколько репрезентативных ингибирующих MASP-3 антител (например, 4D5, 10D12 и 13B1) были гуманизованы. Репрезентативные гуманизованные ингибирующие MASP-3 антитела описаны ниже.

Ниже приведена последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) для репрезентативных гуманизованных ингибирующих MASP-3 антител. CDR согласно Kabat подчеркнуты.

h4D5-14-1-NA_VH (SEQ ID NO:220)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYP
RDDRTKYNDKFKDKATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSLEDTYWGQGTLV
 VSS

h4D5-14-1-NA_VL (SEQ ID NO:221)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR

h4D5-19-1-NA_VH (SEQ ID NO:222)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYP
RDDRTKYNDKFKDRATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSLEDTYWGQGTLV
 VSS

h4D5-19-1-NA_VL (SEQ ID NO:221)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR

h10D12-45-21-GA_VH (SEQ ID NO:223)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINT
YSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAVYFCARGGEAMDYWGQGT
 LTVSS

h10D12-45-21-GA_VL (SEQ ID NO:224)

DVLMQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDAKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTKVEIKR

h10D12-49-21-GA_VH (SEQ ID NO:225)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINT
YSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVRTPYLQISSLKAEDTATYFCARGGEAMDYWGQGLT
 VTVSS

h10D12-49-21-GA_VL (SEQ ID NO:224)

DVLMQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSDAKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTKVEIKR

h13B1-9-1-NA_VH (SEQ ID NO:226)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
GTGSTNYAQKFQGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRSEDVWGQGLTVTV
 SS

h13B1-9-1-NA_VL (SEQ ID NO:227)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

h13B1-10-1-NA_VH (SEQ ID NO:228)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
GTGSTNYNEKFKGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRSEDVWGQGLTVTV
 SS

h13B1-10-1-NA_VL (SEQ ID NO:227)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

ТАБЛИЦА 18 CDR HC mAb, специфичного к MASP-3 человека:

Антитело	Область	Последовательность
h4D5-14-1 NA	HC-CDR1	TDDIN (SEQ ID NO:229)
h4D5-19-1 NA	HC-CDR1	TDDIN (SEQ ID NO:229)
h10D12-45-21-GA	HC-CDR1	SYGMS (SEQ ID NO:230)
h10D12-49-21-GA	HC-CDR1	SYGMS (SEQ ID NO:230)
h13B1-9-1-NA	HC-CDR1	GKWIE (SEQ ID NO:231)
h13B1-10-1-NA	HC-CDR1	GKWIE (SEQ ID NO:231)
h4D5-14-1 NA	HC-CDR2	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:232)
h4D5-19-1 NA	HC-CDR2	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:232)
h10D12-45-21-GA	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:233)
h10D12-49-21-GA	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:233)
h13B1-9-1-NA	HC-CDR2	EILPGTGSTNYAQKFQG (SEQ ID NO:234)
h13B1-10-1-NA	HC-CDR2	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:235)
h4D5-14-1 NA	HC-CDR3	LEDTY (SEQ ID NO:236)

h4D5-19-1 NA	HC-CDR3	LEDTY (SEQ ID NO:236)
h10D12-45-21-GA	HC-CDR3	GGEAMDY (SEQ ID NO:237)
h10D12-49-21-GA	HC-CDR3	GGEAMDY (SEQ ID NO:237)
h13B1-9-1-NA	HC-CDR3	SEDV (SEQ ID NO:238)
h13B1-10-1-NA	HC-CDR3	SEDV (SEQ ID NO:238)

ТАБЛИЦА 19 CDR LC mAb, специфичных к MASP-3 человека:

Антитело	Область	Последовательность
h4D5-14-1 NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:239)
h4D5-19-1 NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:239)
h10D12-45-21-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:240)
h10D12-49-21-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:240)
h13B1-9-1-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:239)
h13B1-10-1-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:239)
h4D5-14-1 NA	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
h4D5-19-1 NA	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
h10D12-45-21-GA	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:241)
h10D12-49-21-GA	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:241)
h13B1-9-1-NA	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
h13B1-10-1-NA	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:178)
h4D5-14-1 NA	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:242)
h4D5-19-1 NA	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:242)
h10D12-45-21-GA	LC-CDR3	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:243)
h10D12-49-21-GA	LC-CDR3	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:243)
h13B1-9-1-NA	LC-CDR3	KQSYNIPT (SEQ ID NO:244)
h13B1-10-1-NA	LC-CDR3	KQSYNIPT (SEQ ID NO:244)

ТАБЛИЦА 20: Репрезентативные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела:

Антитело против MASP-3, справочный №	Вариабельная область тяжелой цепи, а.к. (SEQ ID NO)	Вариабельная область легкой цепи, а.к. (SEQ ID NO)	Тяжелая цепь: CDR1; CDR2; CDR3	Легкая цепь: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)

			(SEQ ID NO)	
h4D5-14-1-NA	220	221	229, 232, 236	239, 178, 242
h4D5-19-1-NA	222	221	229, 232, 236	239, 178, 242
h10D12-45-21-GA	223	224	230, 233, 237	240, 241, 243
h10D12-49-21-GA	225	224	230, 233, 237	240, 241, 243
h13B1-9-1-NA	226	227	231, 234, 238	239, 178, 244
h13B1-10-1-NA	228	227	231, 235, 238	239, 178, 244

В некоторых вариантах осуществления фрагменты варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи ингибирующих MASP-3 антител выделяли в полноразмерном формате IgG4 следующим образом: в некоторых вариантах осуществления химерные mAb подвергали слиянию с константной областью IgG4 человека (SEQ ID NO:70). В некоторых вариантах осуществления химерные mAb подвергали слиянию с константной областью IgG4 человека, которая содержит стабилизирующую аминокислотную замену S228P (SEQ ID NO:71). В некоторых вариантах осуществления химерные mAb подвергали слиянию с константной областью IgG4 человека, которая содержит аминокислотную замену S228P, а также мутацию, которая способствует взаимодействиям FcRn при низких значениях pH (SEQ ID NO:245).

Как дополнительно описано в WO2018/026722, высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела 13B1, 10D12 и 4D5 полностью ингибируют альтернативный путь у млекопитающих, таких как грызуны и не являющиеся приматами животные, в молярных концентрациях, меньших, чем концентрация MASP-3, являющейся мишенью (например, в молярном соотношении от приблизительно 1:1 до приблизительно 2,5:1 (являющаяся мишенью MASP-3 к mAb) (см. примеры 11-21). Как описано в примере 11, введение однократной дозы высокоаффинного ингибирующего MASP-3 антитела mAb 13B1 мышам приводило к практически полному устранению системной активности альтернативного пути комплемента по меньшей мере на 14 суток. Как дополнительно описано в примере 12, в испытании, проведенном на общепризнанной модели на животных, ассоциированной с PNH, было продемонстрировано, что mAb 13B1 значительно повышало выживаемость

PNH-подобных эритроцитов и защищало PNH-подобные эритроциты значительно лучше, чем ингибирование C5. Как описано в примере 13, далее было продемонстрировано, что mAb 13B1 снижало частоту встречаемости и тяжесть заболевания в модели артрита на мышах. Как далее описано в примере WO2018/026722, репрезентативные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 mAb 13B1, 10D12 и 4D5 являются в высокой степени эффективными в отношении блокирования альтернативного пути у приматов. Введение однократной дозы mAb 13B1, 10D12 или 4D5 яванским макакам приводило к длительному снижению системной активности альтернативного пути, длившемуся приблизительно 16 суток. Степень снижения активности альтернативного пути у яванских макаков, которым вводили высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела, была сравнимой со степенью, достигаемой блокадой фактором D *in vitro* и *in vivo*, что указывает на полную блокаду конвертирования фактора D ингибирующими MASP-3 антителами. Таким образом, высокоаффинные ингибирующие MASP-3 mAb обладают терапевтической применимостью при лечении пациентов, страдающих от заболеваний или нарушений, связанных с гиперактивностью альтернативного пути, например, где заболевание или нарушение, связанное с гиперактивностью альтернативного пути (также упоминаемого как заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем) выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), C3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

Пример 11:

Анализ фактора D в образцах яванского макака до и после лечения репрезентативным ингибирующим MASP-3 антителом (13B1) в иммуноанализе с использованием антитела 14A11, специфичного к зрелому фактору D, в качестве антитела детекции.

Справочная информация/обоснование:

Как описано в примере 10, были получены многочисленные высокоаффинные ингибирующие MASP-3 антитела, которые способны ингибировать созревание профактора D в стационарном состоянии (в покое) *in vivo*. В этом примере описан анализ статуса фактора D (т.е. количество зрелого фактора D) у яванского макака после лечения репрезентативным высокоаффинным ингибирующим MASP-3 mAb 13B1, которое известно тем, что оно способно ингибировать активность APC у не являющегося человеком примата.

Способы:

В этом испытании 9 яванским макакам (3 животных на условия mAb) вводили однократную внутривенную дозу 5 мг/кг одного из трех репрезентативных высокоаффинных ингибирующих MASP-3 антител: 4D5, 10D12 или 13B1 (константная область IgG4). Образцы плазмы (EDTA) и сыворотки получали с регулярными интервалами на протяжении периода трех недель или более.

Образцы плазмы после однократной дозы 13B1 у яванского макака тестировали в отношении количества зрелого фактора D следующим образом. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи 3 мкг/мл mAb 3C5 против фактора D человека/яванского макака (IgG4 человека), которое связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D. Планшеты промывали, блокировали и загружали 20-кратными разведениями исследуемых образцов и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания добавляли раствор 3 мкг/мл антитела 14A11, специфичного к зрелому фактору D, и инкубировали в течение 1 часа. После промывания использовали меченное HRP вторичное антитело (HRP-меченный F(ab')₂-фрагмент антитела осла против IgG мыши H&L (Jackson ImmunoResearch)) для получения сигнала от антитела детекции с последующей проявкой посредством субстрата TMB (ThermoFisher). Результаты образцов интерполировали из 4-параметрической логистической кривой для разведений рекомбинантного зрелого фактора D яванского макака. Результаты представлены на фиг.21А и фиг.21В.

Результаты:

На фиг.21А графически иллюстрируется количество зрелого фактора D у яванского макака на протяжении некоторого периода времени после введения репрезентативного ингибирующего MASP-3 mAb 13B1. Как показано на фиг.21А, уровень зрелого фактора D снижается до низкого уровня в пределах 24 часов после введения mAb против MASP-3 и остается низким в течение приблизительно 500 часов после введения.

На фиг.21В графически иллюстрируется стандартная кривая при определении из 4-параметрической логистической кривой для разведений рекомбинантного зрелого фактора D яванского макака. Результаты образцов интерполировали из этой стандартной кривой, и они нанесены на график в качестве мкг/мл зрелого фактора D яванского макака.

Результаты в этом примере демонстрируют, что иммуноанализ с использованием антитела, специфичного к зрелому фактору D, может использоваться для мониторинга сывороточного уровня зрелого фактора D после лечения ингибирующим MASP-3

антителом, которое ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D.

Пример 12

Анализ фармакологии репрезентативного mAb против MASP-3 (13B1) у яванских макаков в качестве части испытания фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) однократной дозы.

Справочная информация/обоснование:

Как продемонстрировано в примере 11, иммуноанализ с использованием антитела, специфичного в отношении зрелого фактора D, может использоваться для мониторинга сывороточного уровня зрелого фактора D после лечения ингибирующим MASP-3 антителом, которое ингибирует конвертирование профактора D в зрелый фактор D. В этом примере описано применение иммуноанализа с использованием антитела, специфичного к зрелому фактору D, для количественного определения концентрации в плазме зрелого фактора D в исследовании фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) однократной дозы у самок яванских макаков.

Способы:

Фармакологию mAb против MASP-3 13B1 у обезьян исследовали в качестве части исследования фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) однократной дозы у самок яванского макака. MAб 13B1 вводили посредством подкожной (п/к) инъекции в дозе 0,5 мг/кг, 1,5 мг/кг или 5 мг/кг; или посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции в дозе 5 мг/кг или 100 мг/кг. Каждая исследуемая группа содержала 3 обезьяны. Получали последовательные образцы крови для оценки PK и PD от момента времени до введения дозы до 1344 часов (8 недель) после введения дозы.

Эффект mAb 13B1 на активность альтернативного пути оценивали путем количественного определения зрелого фактора D в анализе ELISA, а также с использованием анализа активности фактора Ва *ex vivo*. Концентрацию фактора Ва, продуцированного при стимуляции, вычисляли путем вычитания концентрации фактора Ва в образцах без стимуляции из концентрации фактора Ва в образцах после стимуляции. Снижение концентрации зрелого (т.е. активного) фактора D в плазме и снижение концентрации стимулированного фактора Ва указывают на активность PD mAb13B1. Данные о концентрации зрелого фактора D в плазме и концентрации стимулированного фактора Ва обобщали по моменту времени и группе дозы с использованием среднего значения, медианы, стандартного отклонения и коэффициента вариации (CV%).

Образцы сыворотки стимулировали зимозаном для активации альтернативного пути. Степень активации альтернативного пути зимозаном определяли путем количественного определения фактора Ва следующим образом. Для определения образования маркера жидкой фазы Ва, APC индуцировали в анализах *ex vivo* посредством инкубации зимозана (конечная концентрация 1 мг/мл) в сыворотке (конечная концентрация 5%, разбавленная GVB+Mg/EGTA), полученной от яванских макаков, которым вводили mAb против MASP-3. Смеси инкубировали при 37°C в течение 40 минут и активность APC определяли посредством детекции конечных результатов для

комплемента на основе ELISA. Детекцию Ba проводили в реакционных супернатантов с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA (Quidel). Величины поглощения для всех тестов нормализовывали путем принятия величин до введения за 100% активность, и величин для образцов до введения, предварительно инкубированных, но не подвергнутых воздействию зимозана, за 0%.

Анализ ELISA зрелого фактора D: планшеты для ELISA покрывали в течение ночи посредством 3 мкг/мл mAb 3C5 против фактора D человека/яванского макака (IgG4 человека), которое связывается как с профактором D человека, так и со зрелым фактором D. Планшеты промывали, блокировали и загружали 20-кратными разведениями исследуемых образцов и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания добавляли раствор 3 мкг/мл антитела 14A11, специфичного к зрелому фактору D, и инкубировали в течение 1 часа. После промывания добавляли меченное HRP вторичное антитело (Jackson ImmunoResearch) для проявки в анализе.

Результаты:

На фиг.22А графически иллюстрируется концентрация зрелого фактора D у обезьян на протяжении периода времени, составляющего 56 суток (1344 часа), после п/к или внутривенного в/в введения mAb 13B1 против MASP-3, при определении в анализе с использованием ELISA с антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D, в качестве антитела детекции. Как показано на фиг.22А, введение mAb 13B1 обезьянам было ассоциировано с дозозависимым снижением концентрации зрелого фактора D.

На фиг.22В графически иллюстрируется активность альтернативного пути *ex vivo* (% от исходного уровня) на протяжении периода времени 56 суток (1344 часа) после введения mAb13B1 против MASP-3 при определении в анализе с фактором Ba. Как показано на фиг.22В, после введения mAb 13B1 происходило ингибирование активности альтернативного пути *ex vivo* дозозависимым образом. При повышении дозы степень и длительность ингибирования активности *ex vivo* возрастали. После п/к или в/в введения 5 мг/кг mAb 13B1 активность *ex vivo* снижалась приблизительно до 10% от уровней до дозирования в течение приблизительно 2 недель. При наиболее высоких оцененных уровнях дозы происходило ингибирование активности *ex vivo* на протяжении периода взятия образцов.

На фиг.23 графически иллюстрируется взаимосвязь эффектов mAb13B1 против MASP-3 на активность альтернативного пути *ex vivo* и концентрации зрелого фактора D после однократного внутривенного болюса или подкожного введения у обезьян. Как показано на фиг.23, эффект mAb 13B1 на концентрацию зрелого фактора D линейно коррелировал с эффектом mAb 13B1 на активность альтернативного пути *ex vivo*.

Взаимосвязь между концентрацией mAb 13B1 и эффектом PD на концентрацию зрелого CFD в исследовании обезьян исследовали графически и аппроксимировали с использованием сигмовидной модели концентрация-ответ. Вследствие задержки между концентрацией mAb13B1 в сыворотке и снижением концентрации зрелого CFD, данные, полученные до 72 часов после введения дозы, были исключены из анализа. График

полученных данных и аппроксимация модели PD приведены на фиг.24.

На фиг.24 графически иллюстрируется взаимосвязь между сывороточной концентрацией mAb 13B1 против MASP-3 и фармакодинамическим эффектом на концентрацию зрелого фактора эффекта D после однократного введения обезьянам.

Обобщение результатов:

Как и ожидалось для ингибирования MASP-3, ингибирование APC у мышей и не являющихся человеком приматов ассоциировано со снижением активности системного CFD. Определение концентрации CFD в плазме после введения дозы посредством твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), который осуществляет специфическую детекцию либо формы профермента (неактивный профермент), либо зрелой формы, демонстрирует, что mAb13B1 против MASP-3 блокирует созревание CFD в активную форму без поддающегося измерению изменения уровня общего CFD. У не являющихся человеком приматов однократная доза 5 мг/кг введенного п/к mAb13B1 может поддерживать блокаду альтернативного пути на уровне $\geq 90\%$ в течение приблизительно 2 недель.

После введения mAb13B1 против MASP-3 обезьянам происходило ингибирование активности альтернативного пути *ex vivo* дозозависимым образом. При увеличении дозы происходило возрастание степени и длительности ингибирования активности *ex vivo*. После п/к или в/в введения 5 мг/кг mAb13B1 активность *ex vivo* снижалась приблизительно до 10% от уровней до введения дозы в течение приблизительно 2 недель. Введение mAb13B1 обезьянам также было ассоциировано с дозозависимым снижением концентрации зрелого CFD. Эффект mAb13B1 на концентрацию зрелого CFD в основном был линейно связан с эффектом mAb13B1 на активность альтернативного пути *ex vivo*. Эти данные указывают на то, что mAb13B1 ингибирует активность MASP-3 после однократного введения обезьянам и что ингибирование MASP-3 приводит к снижению активности альтернативного пути. Снижение концентрации зрелого фактора D в плазме и концентрации стимулированного фактора Ba продемонстрировало дозозависимое ингибирование посредством mAb13B1 альтернативного пути у обезьян.

Пример 13

Клиническое испытание фазы 1 для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) mAb13B1

Справочная информация/обоснование:

Как описано в настоящем описании, mAb13B1 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с доменом сериновой протеазы в MASP-3 и ингибирует его активность. В этом примере описано первое испытание фазы 1 у человека, которое будет проведено для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) mAb13B1. Анализ PD в этом испытании включает использование способов иммуноанализа, описанных в настоящем описании, для оценки степени ингибирования альтернативного пути комплемента (APC) у индивидуумов, которых лечат mAb13B1, путем захвата и детекции

зрелого фактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция зрелого фактора D проводится с использованием моноклонального антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его фрагмента, который специфически связывается с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующим в зрелом факторе D, но не связывается с профактором D; и/или путем захвата или детекции профактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция профактора D, проводится с использованием моноклонального антитела, специфичного к профактору D, или его фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в факторе D, но не связываются со зрелым фактором D.

Способы:

Первое испытание mAb13B1 фазы 1 у человека будет состоять из испытания с однократной возрастающей дозой в/в и п/к введения mAb13B1 и испытания с многократной возрастающей дозой п/к введения mAb13B1. В обеих частях испытания здоровых индивидуумов будут включать для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK), фармакодинамики (PD) и иммуногенности. Целью испытания с однократной возрастающей дозой будет установление диапазона доз и схемы, которые будут хорошо переносимыми и будут обеспечивать $\geq 90\%$ ингибирование активности MASP-3 в течение приблизительно 30 суток (измеряемое по снижению концентрации зрелого CFD в плазме в иммуноанализе, как описано в настоящем описании). Часть с многократной возрастающей дозой испытания предназначена для определения уровня дозы и частоты п/к дозирования, которые будут обеспечивать $\geq 90\%$ ингибирование MASP-3. Неклинические испытания токсичности mAb13B1 указывают на то, что существует достаточный запас безопасности для проведения первоначального тестирования у человека в предлагаемых дозах у здоровых индивидуумов, и прогнозируется, что уровни доз, исследованные в испытании фазы 1, обеспечат эффективность при заболеваниях, характеризующихся избыточной активностью APC, в течение периода времени, который был бы удобным для пациентов.

Как описано в настоящем описании, mAb13B1 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело (mAb), которое связывается с доменом сериновой протеазы MASP-3 и ингибирует его активность. Посредством ингибирования MASP-3 mAb13B1 блокирует протеолитическую активацию CFD и тем самым нарушает APC и ассоциированное с ним усиление активности комплемента. mAb13B1 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT). mAb13B1 содержит гуманизованную переменную область, происходящую из мыши, слитую с константной областью IgG4 человека, указанной под SEQ ID NO:245. mAb13B1 секретируется в качестве связанного

дисульфидной связью гликозилированного тетрамера, состоящего из 2 идентичных легких цепей каппа из 219 аминокислот и 2 идентичных тяжелых цепей из 440 аминокислот.

Лекарственный продукт, использованный в этом испытании фазы 1, содержит mAb13B1 в концентрации 110 мг/мл, 20 мМ гистидин, 100 мг/мл сахарозы и 0,035% полисорбата 80 при pH 6,0.

Определение дозировки

Как описано в примере 12, взаимосвязь между концентрацией mAb13B1 и эффектом PD на концентрацию зрелого CFD в 2 испытаниях однократной дозы у обезьян исследовали графически и аппроксимировали с использованием сигмовидной модели концентрация-ответ. Вследствие задержки между сывороточной концентрацией mAb 13B1 и снижением концентрации зрелого CFD данные, полученные до 72 часов после введения дозы, исключали из анализа. График наблюдаемых данных и аппроксимация модели PD представлены на фиг.24.

Затем параметры модели PK и PD для mAb13B1 масштабировали для прогнозирования эффекта PK и PD mAb13B1 у человека в широком диапазоне доз. Параметры модели PK масштабировали для человека с использованием аллометрических коэффициентов, обычно используемых для моноклональных антител (Deng R. et al., MAbs, 3(1):61-6, 2011; Dong J. et al., Clin Pharmacokinet 50(2): 131-42, 2011). На основе данных эффективности и аффинности связывания *in vitro*, было предположено, что параметры модели PD у человека являются такими же, как и у обезьян. Модель для mAb13B1 экспозиция-ответ использовали для оценки концентрации mAb13B1, ассоциированной с 10%, 50% и 90% снижением концентрации зрелого CFD. С использованием модели PK для mAb13B1 имитировали сывороточную концентрацию mAb13B1 с течением времени для диапазона в/в и п/к уровней доз у человека. Спрогнозированные величины экспозиции mAb13B1 и эффект PD на протяжении диапазона в/в и п/к уровней доз у человека представлены в таблице 21.

ТАБЛИЦА 21: Спрогнозированная экспозиция mAb13B1 и фармакодинамический эффект после однократного подкожного или внутривенного введения у здоровых добровольцев

Группа	Доза и путь (мг/кг)	Спрогнозированная фармакокинетика		Спрогнозированная фармакодинамика	
		Экспозиция mAb13B1		Уменьшение уровня зрелого CFD	
		C_{\max} (мкг/мл)	AUC _(0-168ч) (мкг*ч/мл)	E_{\max} (%)	Длительность> 90%
1	0,1 в/в ^a	2,07	90,3	~ 10	0
2	0,3 в/в ^a	6,24	323	~ 50	0
3	1 в/в ^a	20,9	1420	~ 90	0

Группа	Доза и путь (мг/кг)	Спрогнозированная фармакокинетика		Спрогнозированная фармакодинамика	
		Экспозиция mAb13B1		Уменьшение уровня зрелого CFD	
		C_{\max} (мкг/мл)	$AUC_{(0-168ч)}$ (мкг*ч/мл)	E_{\max} (%)	Длительность > 90%
4	3 в/в ^a	62,8	5140	> 90	~ 1 неделя
5	3 п/к	31,0	4160	> 90	~ 1 неделя
6	5 п/к	53,5	7310	> 90	~ 2 недели
7	8 п/к	87,6	12100	> 90	~ 4 недели
8	8 в/в ^a	168	14800	> 90	~ 4 недели

$AUC_{(0-168ч)}$ = площадь под кривой концентрации с течением времени от 0 до 168 часов после введения дозы; C_{\max} = максимальная наблюдаемая концентрация; E_{\max} = максимальный фармакодинамический эффект; в/в = внутривенный; CFD = фактор D комплемента; п/к = подкожный

^a инфузия в течение 30 минут

Спрогнозированный профиль фармакокинетики (PK) и фармакодинамическая (PD) активность mAb13B1 указывают на то, что однократное в/в введение 0,1 мг/кг у человека может быть ассоциировано с максимум 10% снижением концентрации зрелого CFD в плазме. Аналогично, спрогнозировано, что однократное п/к или в/в введение 8 мг/кг ассоциировано с >90% снижением уровней зрелого CFD в течение приблизительно 4 недель.

Обобщение результатов

Всего 80 здоровым индивидуумам проводили введение mAb13B1 внутривенно (в/в) в дозировках 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг или подкожно (п/к) в дозировках 3 мг/кг или 5 мг/кг. При всех протестированных дозах mAb13B1 хорошо переносилось без явных сигналов безопасности.

На фиг.25А графически иллюстрируется концентрация mAb13B1 в плазме индивидуумов на протяжении периода времени вплоть до 84 суток после в/в введения mAb13B1 при определении посредством ELISA. Как показано на фиг.25А, увеличение дозирования приводило к более высоким уровням mAb13B1 и более длительному периоду времени, в ходе которого mAb13B1 обнаруживалось в образцах плазмы.

На фиг.25В графически иллюстрируются уровни зрелого фактора D у индивидуумов на протяжении периода времени 84 суток после в/в введения mAb 13B1 против MASP-3 при определении в анализе ELISA с антителом 14A11, специфичным к зрелому фактору D, использованным в качестве антитела детекции. Как показано на фиг.25В, введение mAb 13B1 было ассоциировано с дозозависимым снижением концентрации зрелого фактора D, а также дозозависимым увеличением длительности

эффекта. При дозировках 3 мг/кг в/в введение приводило к снижению уровней зрелого CFD ниже поддающихся детекции уровней (т.е. снижение приблизительно на 90% или более), которое сохранялось в течение вплоть до четырех недель. Также было определено, что однократная наиболее низкая подкожная доза mAb 13B1 была способна снижать концентрацию зрелого фактора D до уровней ниже поддающихся детекции уровней (т.е. снижение приблизительно на 90% или более) в течение четырех недель у большинства индивидуумов.

Эти данные иллюстрируют, что профиль PK и PD при всех протестированных дозировках является благоприятным и обосновывает дозирование mAb 13B1 в низкой дозе один раз в месяц (или реже). Такое дозирование может быть либо внутривенным, либо подкожным.

В продолжающемся испытании фазы 1 была продемонстрирована применимость анализов профактора D и зрелого фактора D для определения фармакодинамического ответа у здоровых добровольцев-людей, которым вводили однократную дозу ингибирующего MASP-3 антитела 13B1. При множестве уровней доз Ab 13B1 концентрации профактора D и зрелого фактора D в плазме неизменно демонстрировали обратную корреляцию. Относительно уровней до введения дозы, исходных уровней, уровни профактора D возрастали по мере снижения уровней зрелого фактора D после введения Ab 13B1. Более того, степень измеренного повышения уровня профактора D неизменно коррелировало со снижением концентрации зрелого фактора D. Это наблюдение согласуется с ожидаемым исходом ингибирования MASP-3 и созревания фактора D у человека, если скорости выведения профактора D и зрелого фактора D не различаются значительно. В целом, результаты двух анализов, которые измеряют две разных формы фактора D согласуются друг с другом и при совместном использовании могут обеспечить дополнительную диагностическую ценность для охарактеризации терапевтического ингибирования MASP-3.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибирующее MASP-3 антитело в водном растворе, содержащем буферную систему, имеющую pH $6,0 \pm 5\%$, $20 \pm 5\%$ мМ гистидин, $100 \pm 5\%$ мг/мл сахарозы и $0,035\% \pm 5\%$, полисорбата 80, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело включено в концентрации 110 мг/мл $\pm 5\%$, и где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT). В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи,

обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:227, и варибельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:227. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, антитела мыши и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и целого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело, кроме того, содержит константную область иммуноглобулина. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека с мутацией S228P. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-3 антитело содержит мутацию, которая способствует взаимодействиям FcRn при низких значениях pH, например, где ингибирующее MASP-3 антитело содержит константную область IgG4 человека, указанную под SEQ ID NO:245. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, в дозировке в диапазоне от 0,1 до 10 мг ингибирующего MASP-3 антитела на кг массы тела (как например, от 0,1 мг/кг до 8 мг/кг, от 0,3 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,3 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 2 мг/кг до 5 мг/кг, 0,1±5% мг/кг, 0,3±5% мг/кг, 1,0±5% мг/кг, 3,0±5% мг/кг, 5,0±5% мг/кг или 8,0±5% мг/кг). В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, в дозировке в диапазоне от 0,5 до 5 мл на 100 кг массы тела (как например, от 0,7 мл до 4,5 мл, от 1,0 мл до 3,5 мл, от 1,5 мл до 3,0 мл, от 2 мл до 2,5 мл, 0,5±5% мл, 0,7±5% мл, 1,1±5% мл, 1,4±5% мл, 2,1±5% мл, 2,3±5% мл, 2,8±5% мл, 3,4±5% мл или 4,5±5% мл).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к изделию, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую ингибирующее MASP-3 антитело в единичной дозированной форме, пригодной для терапевтического введения человеку, такой как единичная дозировка в диапазоне от 10 мг до 1000 мг (такая как от 50 мг до 800 мг, или от 75 мг до 500, такая как от 100 мг до 300 мг, такая как от 125 до 275 мг, такая как от 150 до 200 мг, такая как 150±5% мг, 155±5% мг, 160±5% мг, 165±5% мг, 170±5% мг, 175±5% мг, 180±5% мг, 185±5% мг или 190±5% мг) ингибирующего MASP-3 антитела, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и варибельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239,

LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

В то время как предпочтительный вариант осуществления изобретения проиллюстрирован и описан, будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения без отклонения от сути и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5).

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и не связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2).

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело представляет собой гуманизованное, химерное или полностью человеческое антитело.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечную молекулу.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает зрелый фактор D человека с K_D менее 10 нМ.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: а) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSXMGVS (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность HIYWDDEKHYXPSLKX (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность RYYGYXXMXU (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHPPT (SEQ ID NO:54).

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где выделенное антитело или его фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19;

(c) VH, содержащего SEQ ID NO:12, и VL, содержащего SEQ ID NO:18; и/или

(d) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:13, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:19.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:33, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:34; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 36; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:58, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.15, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:14, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:20.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:38, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:60, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.17, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:15, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:21.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:62, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.19, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:16, и VL, содержащего SEQ ID NO:22.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где связывающий домен содержит следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:43, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:39; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 47; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:63, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:64, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере

одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и/или

(c) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:17, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:23.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.11-22.

24. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.11-22.

25. Клонированный вектор или экспрессирующая кассета, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по п.23 и/или п.24.

26. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по п.23 или п.24.

27. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, включающий культивирование клетки по п.26 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, и выделение указанного антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

28. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.1-22.

29. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.1-22.

30. Набор для детекции наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер, и (b) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.1-22.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

32. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.31, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2) и не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3).

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.31 или 32, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-33, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.

35. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-34, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

36. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-35, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечную молекулу.

37. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-36, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

38. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-37, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает профактор D человека с K_D менее 10 нМ.

39. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-38, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.

40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-39, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на подложке.

41. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, по любому из пп.31-39, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

42. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-41, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145.

43. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-42, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая

аминокислотную последовательность XYWMS (SEQ ID NO:201), где X в положении 1 представляет собой N, S или T; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность EIRLKSXNYAXXYXESVKG (SEQ ID NO:202), где X в положении 7 представляет собой D или E, X в положении 11 представляет собой T или A, X в положении 12 представляет собой H или Y и X в положении 14 представляет собой A или T; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность AWFAX (SEQ ID NO:203), где X в положении 5 представляет собой S, Y или N; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSSQXLLYSXDQKNYLA (SEQ ID NO:204), где X в положении 1 представляет собой M или K, X в положении 5 представляет собой S или N, и X в положении 10 представляет собой K или R; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO:178);, и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность LQYYXYPYT (SEQ ID NO:205), где X в положении 5 представляет собой T или S.

44. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-43, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:149 или SEQ ID NO:155, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:151 или SEQ ID NO:156; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:153; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:176, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:180.

45. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.44, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:136;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:137;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:142;

(d) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:143;

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:136, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:142; и/или

(f) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:137, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:143.

46. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-43, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:158, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:159 или SEQ ID NO:163; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:161 или SEQ ID NO:165; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID

NO:184 или SEQ ID NO:189, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:178, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:187.

47. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.46, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:138;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:139;

(b) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:144;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:145;

(d) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:138, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:144; и/или

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:139, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:145.

48. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-41, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147.

49. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.31-41, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) CDR-H1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) CDR-H2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) CDR-H3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) CDR-L1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) CDR-L2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) CDR-L3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID NO:200.

50. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.49, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

(a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:140;

(b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:141;

(c) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:146;

(d) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:147;

(e) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:140, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:146; и/или

(f) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:141, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:147.

51. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, по любому из пп.31-50.

52. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, по любому из пп.31-50.

53. Клонированный вектор или экспрессирующая кассета, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, по п.51 и/или п.52.

54. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, по п.51 и/или п.52.

55. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с профактором D человека, включающий культивирование по п.54 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека, и выделение указанного антитела, специфичного к указанному профактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

56. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека по любому из пп.31-50.

57. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают профактор D человека, по любому из пп.31-50.

58. Набор для детекции наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем указанный набор содержит (a) по меньшей мере один контейнер, и (b) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают зрелый фактор D человека, по любому из пп.31-50.

59. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

60. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.59, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

61. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.59 или 60, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.

62. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-61, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

63. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-62, где указанное антитело представляет собой одноцепочечную молекулу.

64. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-63, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

65. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-64, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фактором D человека с K_D менее 10 нМ.

66. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-65, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью.

67. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-66, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на подложке.

68. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с профактором D человека, по любому из пп.59-67, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

69. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.59-68, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99 (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

70. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из

пп.59-68, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101 (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103 или 107 (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105 или 108, (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60 или 123; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119, 124 или 126, и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:121 или 125.

71. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.70, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одно из:

- (a) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:85;
- (b) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:86;
- (c) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:87;
- (d) VH-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:88;
- (e) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:89;
- (f) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:90;
- (g) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:91;
- (h) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:92;
- (i) VL-домена, обладающего по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:93;
- (j) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:85, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:89 или SEQ ID NO:90;
- (k) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:86, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:91;
- (l) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:87, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:92; и/или
- (m) VH-домена, содержащего SEQ ID NO:88, и VL-домена, содержащего SEQ ID NO:93.

72. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR варибельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и профактора D человека, по любому из

пп.59-71.

73. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и профактора D человека, по любому из пп.59-71.

74. Клонированный вектор или экспрессирующая кассета, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и профактора D человека, по п.72 и/или п.73.

75. Клетка, содержащая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и профактора D человека, по п.72 и/или п.73.

76. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D, включающий культивирование клетки по п.75 в условиях, позволяющих экспрессию молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают фактор D человека, и выделение указанного антитела против фактора D или его антигенсвязывающего фрагмента.

77. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека по любому из пп.59-71.

78. Подложка для применения в иммуноанализе, содержащая по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, по любому из пп.59-71.

79. Набор для детекции присутствия фактора D в биологическом образце, причем указанный набор содержит (а) по меньшей мере один контейнер и (б) по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим для зрелого фактора D человека и для профактора D человека, по любому из пп.59-71.

80. Набор, содержащий по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое специфически выявляет или количественно определяет зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и/или профактор D (SEQ ID NO:2) в иммуноанализе, где по меньшей мере одно моноклональное антитело включает:

(i) моноклональное антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, охватывающим N-конец зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5) и где указанное антитело не связывается с профактором D человека (SEQ ID NO:2); или

(ii) моноклональное антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из "APPRGR" (SEQ ID NO:4) и где указанное антитело не связывается со зрелым фактором D (SEQ ID NO:3).

81. Набор по п.80, где набор дополнительно содержит антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека (SEQ ID NO:3), так и для профактора D человека (SEQ ID NO:2).

82. Набор по п.80 или 81, где набор дополнительно содержит по меньшей мере один контейнер.

83. Набор по любому из пп.80-82, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (i), которые специфически связываются со зрелым фактором D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

84. Набор по любому из пп.80-83, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (ii), которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде фактора D человека, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

85. Набор по любому из пп.80-84, где иммуноанализ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

86. Набор по п.80, где антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (i) представляет собой антитело покрытия.

87. Набор по п.80, где антитело, специфичное к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (i) представляет собой антитело детекции.

88. Набор по п.80, где антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (ii) представляет собой антитело покрытия.

89. Набор по п.80, где антитело, специфичное к профактору D, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно подразделу (ii) представляет собой антитело детекции.

90. Набор по п.81, где антитело против фактора D или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-88, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-93, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

91. Способ определения наличия или количества зрелого фактора D в тестируемом образце, причем способ включает:

(a) приведение тестируемого образца в контакт с моноклональным антителом, специфичным к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающим фрагментом, в иммуноанализе *in vitro*; и

(b) детекцию наличия или отсутствия, или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество зрелого фактора D в образце;

где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D, указанном в качестве аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5).

92. Способ по п.91, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3) и не связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2).

93. Способ по п.91 или 92, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.

94. Способ по любому из пп.91-93, где иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

95. Способ по любому из пп.91-94, где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью и стадия (b) включает детекцию наличия или количества поддающейся детекции части.

96. Способ по любому из пп.91-94, где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и детекцию наличия или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом, специфичным к зрелому фактору D.

97. Способ по любому из пп.91-96 где указанное антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/покрытие) и детекцию связанного зрелого фактора D проводят с использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D.

98. Способ по любому из пп.91-97, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего, например, где биологический

образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

99. Способ по п.98, где млекопитающее страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем.

100. Способ по п.98 или 99, где млекопитающее лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

101. Способ по любому из пп.91-100, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

102. Способ по любому из пп.91-101, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: а) HC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность XSXMGVS (SEQ ID NO:65), где X в положении 1 представляет собой T, I или S и X в положении 3 представляет собой G или I; (b) HC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность HIYWDEKHYXPSLKX (SEQ ID NO:66), где X в положении 11 представляет собой H или N и X в положении 16 представляет собой S или R; (c) HC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность RYYGYXXXMXU (SEQ ID NO:67), где X в положении 6 представляет собой R, G или N, X в положении 7 представляет собой S или Y, X в положении 8 представляет собой F, I или V, и X в положении 10 представляет собой D или H; (d) LC-CDR1, содержащая аминокислотную последовательность RSXXSIXHNSNGNTYXE (SEQ ID NO:68), где X в положении 3 представляет собой N или S, X в положении 4 представляет собой Q или E, X в положении 7 представляет собой V или L, и X в положении 15 представляет собой F или L; (e) LC-CDR2, содержащая аминокислотную последовательность KVXNRFS (SEQ ID NO:69), где X в положении 3 представляет собой S или Y; и (f) LC-CDR3, содержащая аминокислотную последовательность FQGSHVPPT (SEQ ID NO:54).

103. Способ по п.102, где антитело, специфичное к зрелому фактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) HC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:25, (b) HC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:27; (c) HC-CDR3, содержащая SEQ ID NO: 29; (d) LC-CDR1, содержащая SEQ ID NO:50, (e) LC-CDR2, содержащая SEQ ID NO:52, и (f) LC-CDR3, содержащая SEQ ID NO:54.

104. Способ определения наличия или количества профактора D в тестируемом образце, причем способ включает:

(а) приведение в контакт тестируемого образца с моноклональным антителом,

специфичным к профактору D человека, или его антигенсвязывающим фрагментом в иммуноанализе *in vitro*; и

(b) детекцию наличия или отсутствия, или количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с профактором D, где наличие связывания указывает на наличие или количество профактора D в образце;

где антитело, специфичное к зрелому профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом в активационном ("про") пептиде фактора D человека, указанном как "APPRGR" (SEQ ID NO:4).

105. Способ по п.104, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает профактор D человека (SEQ ID NO:2) и не связывает зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3).

106. Способ по п.104 или 105, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке.

107. Способ по любому из пп.104-106, где иммуноанализ представляет собой анализ ELISA.

108. Способ по любому из пп.104-107, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым поддающейся детекции частью и стадия (b) включает детекцию наличия или количества поддающейся детекции части.

109. Способ по любому из пп.104-107, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент является голым (т.е. немеченым), и наличие или количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного со зрелым фактором D, проводят с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом, специфичным к профактору D.

110. Способ по любому из пп.104-109, где указанное антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/покрытие) и детекцию связанного профактора D проводят с использованием второго антитела, которое связывается с отличающимся эпитопом фактора D.

111. Способ по любому из пп.104-110, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего, например, где биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и цереброспинальной жидкости.

112. Способ по п.111, где млекопитающее страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленное альтернативным путем.

113. Способ по п.111 или 112, где млекопитающее лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

114. Способ по любому из пп.104-113, где антитело, специфичное к профактору D

человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

115. Способ по любому из пп.104-113, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-139, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-145, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

116. Способ по любому из пп.104-113, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

117. Способ по любому из пп.104-113, где антитело, специфичное к профактору D человека, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающий домен, содержащий следующие шесть CDR: (a) CDR-H1, содержащая SEQ ID NO:167, (b) CDR-H2, содержащая SEQ ID NO:169 или SEQ ID NO:173; (c) CDR-H3, содержащая SEQ ID NO:171 или SEQ ID NO:174; (d) CDR-L1, содержащая SEQ ID NO:194, (e) CDR-L2, содержащая SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:199, и (f) CDR-L3, содержащая SEQ ID NO:198 или SEQ ID NO:200.

118. Способ оценки степени активации альтернативного пути комплемента (APC) в тестируемом образце, включающий:

(a) предоставление тестируемого образца;

(b) проведение иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из:

(i) захвата и детекции зрелого фактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция зрелого фактора D проводится с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D; и/или

(ii) захвата и детекции профактора D в тестируемом образце, где либо захват, либо детекция профактора D проводится с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе

D, но не связываются со зрелым фактором D; и

(с) сравнения уровня зрелого фактора D, детектированного в соответствии с (b)(i), с заданным уровнем или контрольным образцом и/или сравнения уровня профактора D, детектированного в соответствии с (b)(ii), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень зрелого фактора D и/или профактора D, детектированный в тестируемом образце, указывает на степень активации альтернативного пути комплемента.

119. Способ по п.118, где стадия (b)(i) включает захват зрелого фактора D с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связывается с профактором D, и детекцию с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека.

120. Способ по п.118, где стадия (b)(i) включает захват зрелого фактора D с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, и детекцию с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D.

121. Способ по любому из пп.118-120, где стадия (b)(ii) включает захват профактора D с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D, и детекцию с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека.

122. Способ по любому из пп.118-120, где стадия (b)(ii) включает захват профактора D с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, и детекцию с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D.

123. Способ по любому из пп.118-122, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в "ILGGREA" (SEQ ID NO:5), присутствующем в зрелом факторе D, но не связываются с профактором D, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-17, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

124. Способ по любому из пп.118-123, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на активационном ("про") пептиде "APPRGR" (SEQ ID NO:4), присутствующем в профакторе D, но не связываются со зрелым фактором D, содержат связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136-141, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142-147, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

125. Способ по любому из пп.118-124, где тестируемый образец представляет собой биологический образец, полученный от млекопитающего.

126. Способ по п.125, где биологический образец включает цельную кровь, сыворотку, плазму, мочу или цереброспинальную жидкость.

127. Способ по любому из пп.118-126, где тестируемый образец содержит ингибитор комплемента, такой как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 средство.

128. Способ по п.125, где млекопитающее лечат ингибитором комплемента, таким как ингибитор альтернативного пути комплемента, такой как ингибитор созревания профактора D, такой как ингибирующее MASP-3 средство, и анализ используют для определения степени ингибирования альтернативного пути.

129. Способ по п.125 или п.128, где млекопитающим является человек.

130. Способ по п.129, где человек страдает от, или имеет риск развития, или предположительно имеет заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем.

131. Способ по п.130, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелиита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-

нефропатии и миастении.

132. Способ по п.128, где контрольный образец представляет собой образец, полученный от индивидуума до лечения ингибирующим MASP-3 средством, или образец, полученный в более ранний момент времени в ходе лечения ингибирующим MASP-3 средством.

133. Способ по п.128 или 132, где ингибирующее MASP-3 средство представляет собой ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

134. Способ по п.133, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) вариательная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и вариательную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) вариательная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и вариательная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTTHFPWT); или

(iv) вариательная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и вариательная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

135. Способ мониторинга эффективности лечения ингибирующим MASP-3 антителом у млекопитающего, причем способ включает:

(a) введение дозы ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему в первый момент времени;

(b) оценку первой концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (a);

(с) введение индивидууму ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента во второй момент времени;

(d) оценку второй концентрации зрелого фактора D и/или профактора D в биологическом образце, полученном от индивидуума после стадии (с); и

(е) сравнение уровня зрелого фактора D и/или профактора D, оцененного на стадии (b), с уровнем зрелого фактора D и/или профактора D, оцененным на стадии (d), для определения эффективности ингибирующего MASP-3 антитела у млекопитающего.

136. Способ по п.135, где способ дополнительно включает коррекцию дозы ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

137. Способ по п.136, где дозу ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента увеличивают, если уровень зрелого фактора D является более высоким, чем в случае контроля или эталонного стандарта.

138. Способ по п.136, где дозу ингибирующего MASP-3 антитела или антигенсвязывающего фрагмента, вводимого индивидууму, увеличивают, если уровень профактора D является более низким, чем в случае контроля или эталонного стандарта.

139. Способ по п.137 или 138, где, если индивидууму вводят увеличенную дозу ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, стадии (b)-(е) повторяют для определения того, является ли увеличенная доза достаточной для коррекции уровня зрелого фактора D и/или профактора D до желаемого уровня по сравнению с соответствующим контролем или эталонным стандартом.

140. Способ по п.135, где стадии (b) и (d) включают оценку концентрации зрелого фактора D в биологических образцах в иммуноанализе.

141. Способ по п.140, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5), и не связываются с профактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или количественного определения белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), но не белка профактора D (SEQ ID NO:2), которые могут присутствовать в биологическом образце.

142. Способ по п.135, где стадии (b) и (d) включают оценку концентрации профактора D в биологических образцах в иммуноанализе.

143. Способ по п.142, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в пропептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот APPRGR (SEQ ID NO:4), и не связываются со зрелым фактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека,

где первое и второе антитела служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или количественного определения белка профактора D (SEQ ID NO:2), но не зрелого белка фактора D (SEQ ID NO:3), который может присутствовать в биологическом образце.

144. Способ по любому из пп.135-143, где млекопитающим является человек.

145. Способ по п.144, где человек страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем.

146. Способ по п.145, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиеелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

147. Способ по п.135 где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

148. Способ по п.147, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3 и содержат по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 варибельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) варибельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и

вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTHTFPWT); или

(iv) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

149. Способ лечения млекопитающего, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, включающий введение ингибирующего MASP-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента индивидууму, если определено, что индивидуум имеет:

(i) более низкий или сниженный уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем D или по сравнению с уровнем профактора D в одном или нескольких контрольных образцах: и/или

(ii) более высокий или повышенный уровень зрелого фактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, по сравнению с заданным уровнем зрелого фактора D или по сравнению с уровнем зрелого фактора D в одном или нескольких контрольных образцах.

150. Способ по п.149, где уровень профактора D в одном или нескольких образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа, включающего применение моноклонального антитела, специфичного к профактору D.

151. Способ по п.150, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в пропептиде фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот APPRGR (SEQ ID NO:4), и не связываются со зрелым фактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или их антигенсвязывающие фрагменты служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции или количественного определения белка профактора D (SEQ ID NO:2), но не белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), которые могут присутствовать в образце.

152. Способ по п.149, где уровень зрелого фактора D в одном или нескольких

образцах, полученных от индивидуума, определяют путем проведения иммуноанализа, включающего применение моноклонального антитела, специфичного к зрелому фактору D, или его антигенсвязывающего фрагмента.

153. Способ по п.152, где иммуноанализ включает (i) первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевой области зрелого фактора D человека, где эпитоп содержит или состоит из аминокислот ILGGREA (SEQ ID NO:5), и не связываются с профактором D человека; и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, общим как для зрелого фактора D человека, так и для профактора D человека, где первое и второе антитело или их антигенсвязывающие фрагменты служат вместе в иммуноанализе для специфической детекции и количественного определения белка зрелого фактора D (SEQ ID NO:3), но не белка профактора D (SEQ ID NO:2), которые могут присутствовать в образце.

154. Способ по любому из пп.149-153, где млекопитающим является человек.

155. Способ по п.154, где человек страдает от или имеет риск развития заболевания или нарушения, обусловленного альтернативным путем, выбранного из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелиита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), С3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA- васкулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.

156. Способ по п.149, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

157. Способ по п.156, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MASP-3, и содержит по меньшей мере одно из следующих:

(i) связывающий домен, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3

вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220, 222, 223, 225, 226 и 228, и содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 224 и 227, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:229 (TDDIN), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:232 (WIYPRDDRTKYNDKFKD), HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:236 (LEDTY); и вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239 (KSSQSLLASRTRKNYLA), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:242 (KQSYNLYT);

(iii) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:230 (SYGMS), HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:233 (WINTYSGVPTYADDFKG), и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:237 (GGEAMDY); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:240 (KSSQSLLDSDAKTYLN), LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:241 (LVSKLDS), и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:243 (WQGTTHFPWT); или

(iv) вариабельная область тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

158. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в водном растворе, содержащем буферную систему, имеющую pH 6,0±5%, 20±5% mM гистидин, 100±5% мг/мл сахарозы и 0,035%±5%, полисорбата 80, где указанное ингибирующее MASP-3 антитело включено в концентрации 110 мг/мл±5%, и где указанное ингибирующее MASP-3 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:231 (GKWIE); HC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:234 (EILPGTGSTNYNEKFKG) или SEQ ID NO:235 (EILPGTGSTNYAQKFQG); и HC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:238 (SEDV); и вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, содержащую SEQ ID NO:239, LC-CDR2, содержащую SEQ ID NO:178 (WASTRES); и LC-CDR3, содержащую SEQ ID NO:244 (KQSYNIPT).

159. Фармацевтическая композиция по п.158, где фармацевтическая композиция является стерильной.

160. Фармацевтическая композиция по п.158, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO:227, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID

NO:227.

161. Фармацевтическая композиция по любому из пп.158-160, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, антитела мыши и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных.

162. Фармацевтическая композиция по любому из пп.158-161, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и целого антитела.

163. Фармацевтическая композиция по любому из пп.158-162, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область иммуноглобулина.

164. Фармацевтическая композиция по любому из пп.158-163, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека.

165. Фармацевтическая композиция по п.164, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека с мутаций S228P.

166. Фармацевтическая композиция по п.164 или 165, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию, которая способствует взаимодействиям FcRn при низких значениях pH.

167. Фармацевтическая композиция по п.166, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека, указанную под SEQ ID NO:245.

168. Изделие, содержащее фармацевтическую композицию по любому из пп.158-167.

169. Изделие по п.168, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент находится в единичной дозированной форме от 10 мг до 1000 мг, пригодной для терапевтического введения человеку.

170. Изделие по п.169, где ингибирующее MASP-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент находится в единичной дозированной форме от 100 мг до 200 мг, пригодной для терапевтического введения человеку.

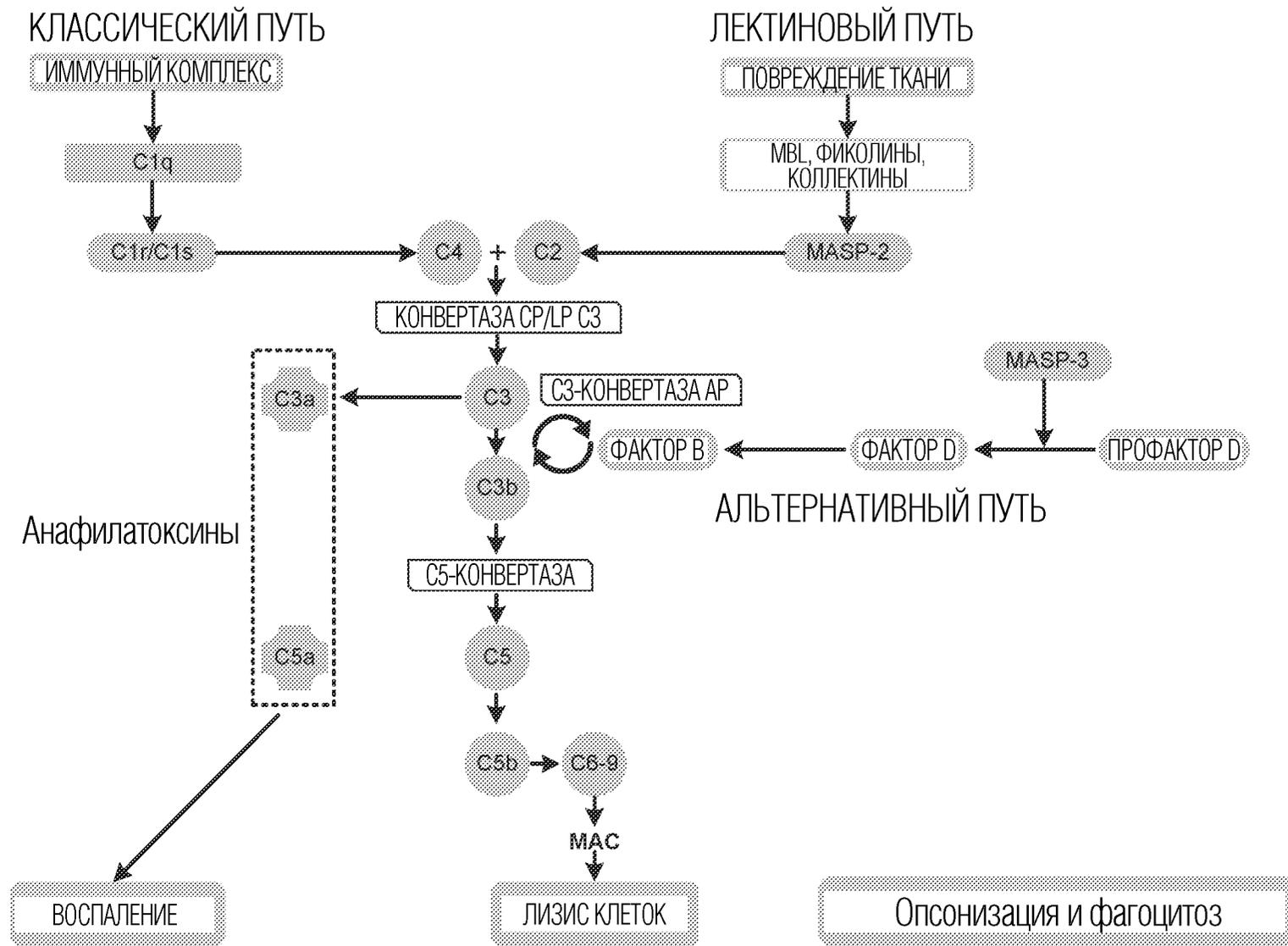
171. Изделие по любому из пп.168-170, где изделие содержит контейнер и ярлык или вкладыш в упаковку на или прилагаемый к контейнеру.

172. Изделие по п.171, где контейнер выбран из группы, состоящей из бутылки, ампулы, пакета (например, пакет для внутривенных инфузий), флакона, шприца и кассеты.

173. Фармацевтическая композиция по любому из пп.158-167 или изделие по любому из пп.168-172, где композиция и/или изделие предназначены для применения для лечения индивидуума, страдающего от или имеющего риск развития заболевания или

нарушения, обусловленного альтернативным путем.

174. Фармацевтическая композиция или изделие по п.173, где заболевание или нарушение, обусловленное альтернативным путем, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), связанной со старением дегенерации желтого пятна (AMD, включая влажную и сухую AMD), реперфузионного повреждения, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической микроангиопатии (включая гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP) или ассоциированную с трансплантацией TMA), астмы, болезни плотного осадка, слабоиммунного некротизирующего серповидного гломерулонефрита, травматического повреждения головного мозга, аспирационной пневмонии, эндофтальмита, оптического нейромиелита, болезни Бехчета, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), диабетической ретинопатии, увеита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), C3-гломерулопатии, отторжения трансплантата, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), гемодиализа, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), ANCA-вакулита, антифосфолипидного синдрома, атеросклероза, IgA-нефропатии и миастении.



ФИГ. 1

Полноразмерный фактор D человека (SEQ ID NO:1)

MHSWERLAVLVLLGAAACAAPPRGRIILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLSAAHCLED
AADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYDVLRAVPHPSQPDIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDR
DVAPGTLCDVAGWGI VNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATCNRRTHHDGAI TERLMCAESNRRDSCCKGDSGG
PLVCGGVLEGVVTS GSRVCGNRKKPGIYTRVAS YAAWIDSVLA

Профактор D человека (SEQ ID NO:2)

APPRGRIILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLSAAHCLED
AADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYDVLRAVPHPSQPDIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDR
DVAPGTLCDVAGWGI VNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATCNRRTHHDGAI TERLMCAESNRRDSCCKGDSGG
PLVCGGVLEGVVTS GSRVCGNRKKPGIYTRVAS YAAWIDSVLA

Зрелый фактор D человека (SEQ ID NO:3)

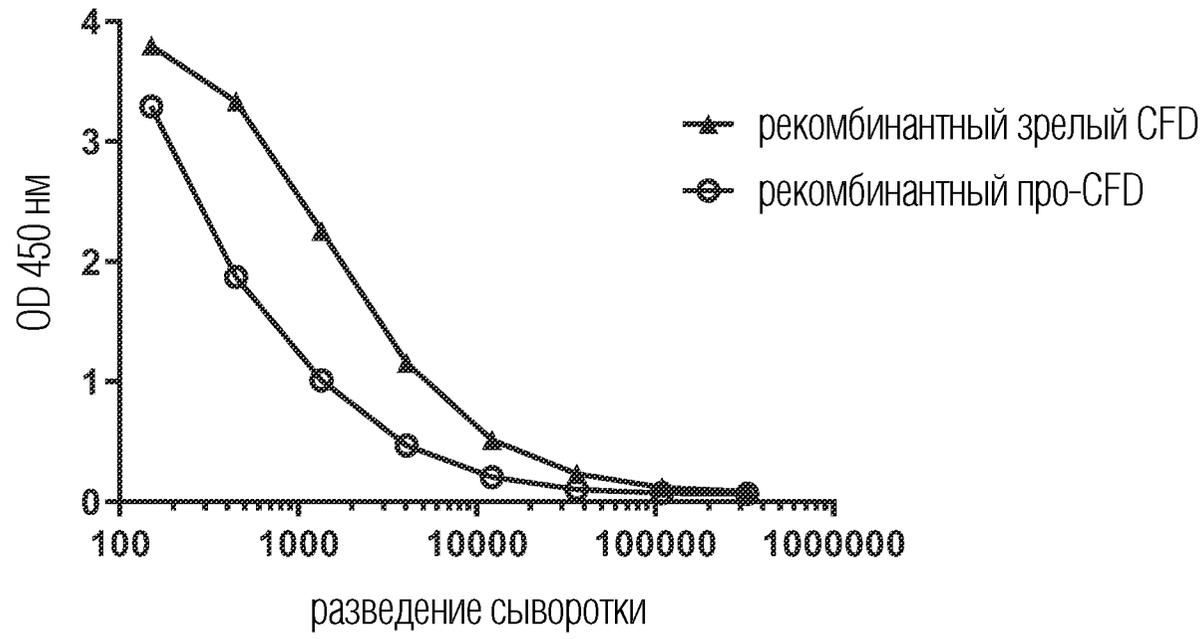
ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLSAAHCLED
AADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYDVLRAVPHPSQPDIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDR
DVAPGTLCDVAGWGI VNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATCNRRTHHDGAI TERLMCAESNRRDSCCKGDSGG
PLVCGGVLEGVVTS GSRVCGNRKKPGIYTRVAS YAAWIDSVLA

ФИГ. 2

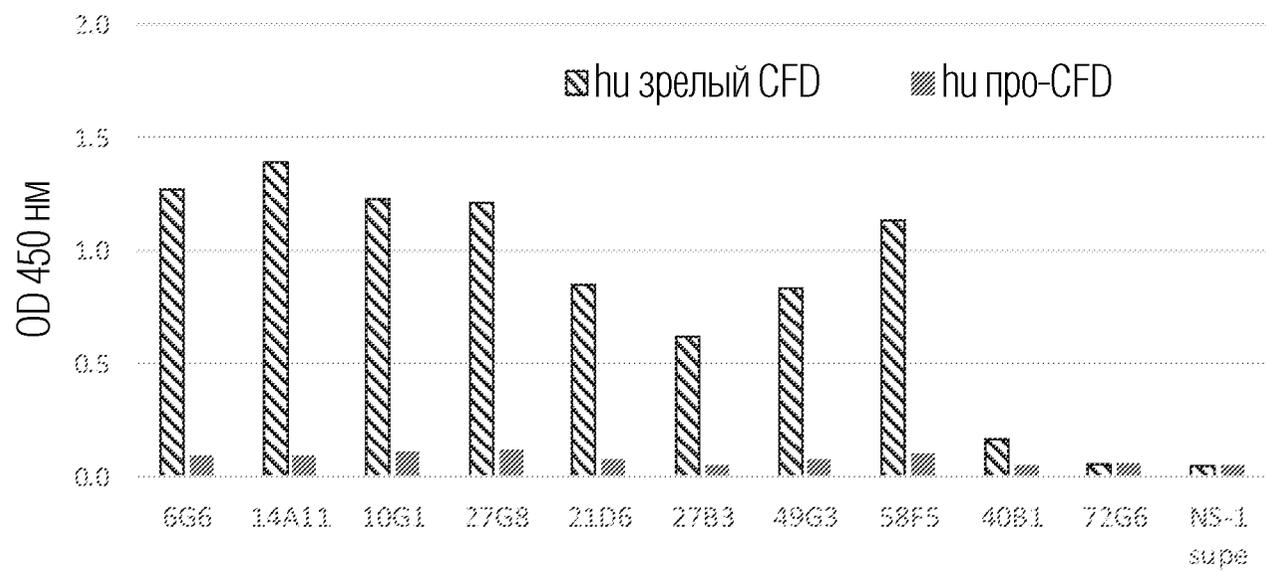
	Сигнальный пептид	Активационный пептид	Зрелый фактор D		
Homo	---MHSWERLAVLVLLGAAA	EAAPPR	RILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVA	.. (а.к. 1-57 SIN:1)
Macaca	---MHSWEHLAVLVLLGVAACAA	QPRGRILGGREAEAHARPYMASVQVNGEHLCCGGVLVA	...	(а.к. 1-57 SIN:8)
Canis	MAPRLGPVPLVPLVLLGAALCAA	QPRGRILGGSEAEASHARPYMASVQVDGKHVCCGGFLVS	...	(а.к. 1-60 SIN:9)
Rattus	---MHSSVYLVALVVLEAAVCVA	QPRGRILGGQEAMAHARPYMASVQVNGTHVCCGGTLVD	...	(а.к. 1-57 SIN:10)
Mus	---MHSSVYFVALVILGAAVCAA	QPRGRILGGQEAAAARPYMASVQVNGTHVCCGGTLLD	...	(а.к. 1-57 SIN:11)

ФИГ. 3

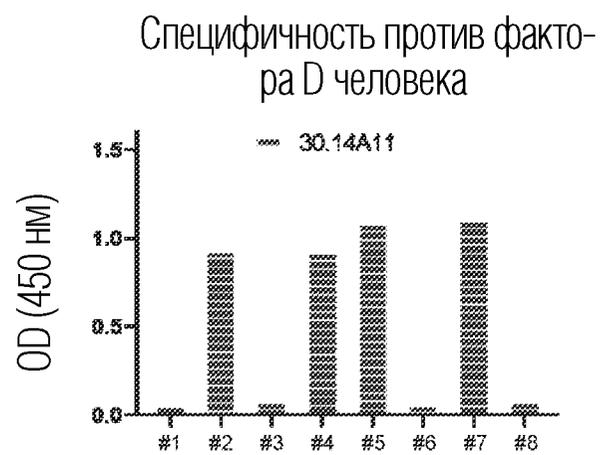
Титрование антисыворотки мыши #2



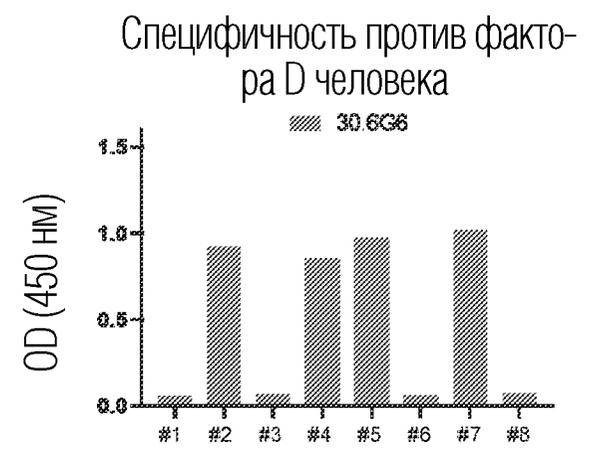
ФИГ. 4



ФИГ. 5

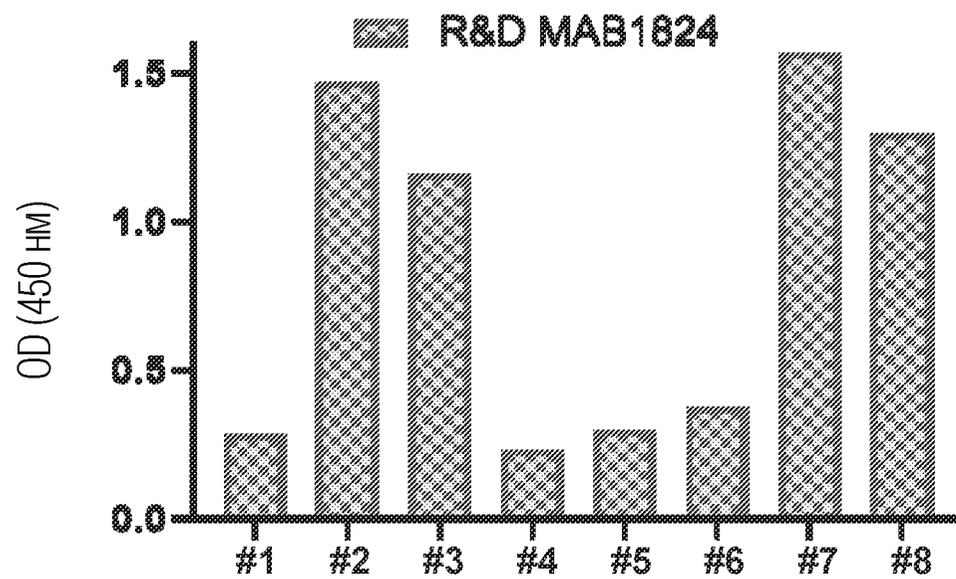


ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

Специфичность против фактора D человека



ФИГ. 6С

Антитела, специфичные к зрелому фактору D человека: переменная область тяжелой цепи

VH

Kabat

		31	35	50	65		95	102				
6G6	QITLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGISLT	<u>ISGMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKS</u> RRLT	ISKDASRNQV	FFRILSVDTA	DTATYYCALR	<u>YYGYRSEFMDY</u>	WGQGTSVTVS	S (SIN:12)
14A11	QITLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGVSLT	<u>ISGMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKS</u> RRLT	ISKDASRNQV	FFRILSVDTA	DTATYYCALR	<u>YYGYRSEFMDY</u>	WGQGTSVTVS	S (SIN:13)
27B3	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGISLN	<u>ISGMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKR</u> RRLT	ISKDASRNQV	FFRISSVDSA	DTATYYCALR	<u>YYGYGSIIMDY</u>	WGHGTSVTVS	S (SIN:14)
58F5	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGISLN	<u>TSIMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKS</u> RRLT	ISKDASRNQV	FLKIISVDTA	DTATYYCALR	<u>YYGYNYVMHY</u>	WGQGTSVTVS	S (SIN:15)
49G3	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGISLS	<u>SSGMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKS</u> RRLT	ISKDASRNQI	FLKIISVDTA	DTATYYCALR	<u>YYGYNYVMHY</u>	WGQGTSVTVS	S (SIN:16)
10G1	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	TCSFSGVSL	<u>SSGMGV</u> SWIR	QPSGKGLEWL	<u>AHLYWDEKH</u> <u>YNPSLKS</u> RRLT	ISKGASRNQV	FLKIISVDTA	DTATYYCALR	<u>YYGYNSIMHY</u>	WGQASVTVS	S (SIN:17)

ФИГ. 7А

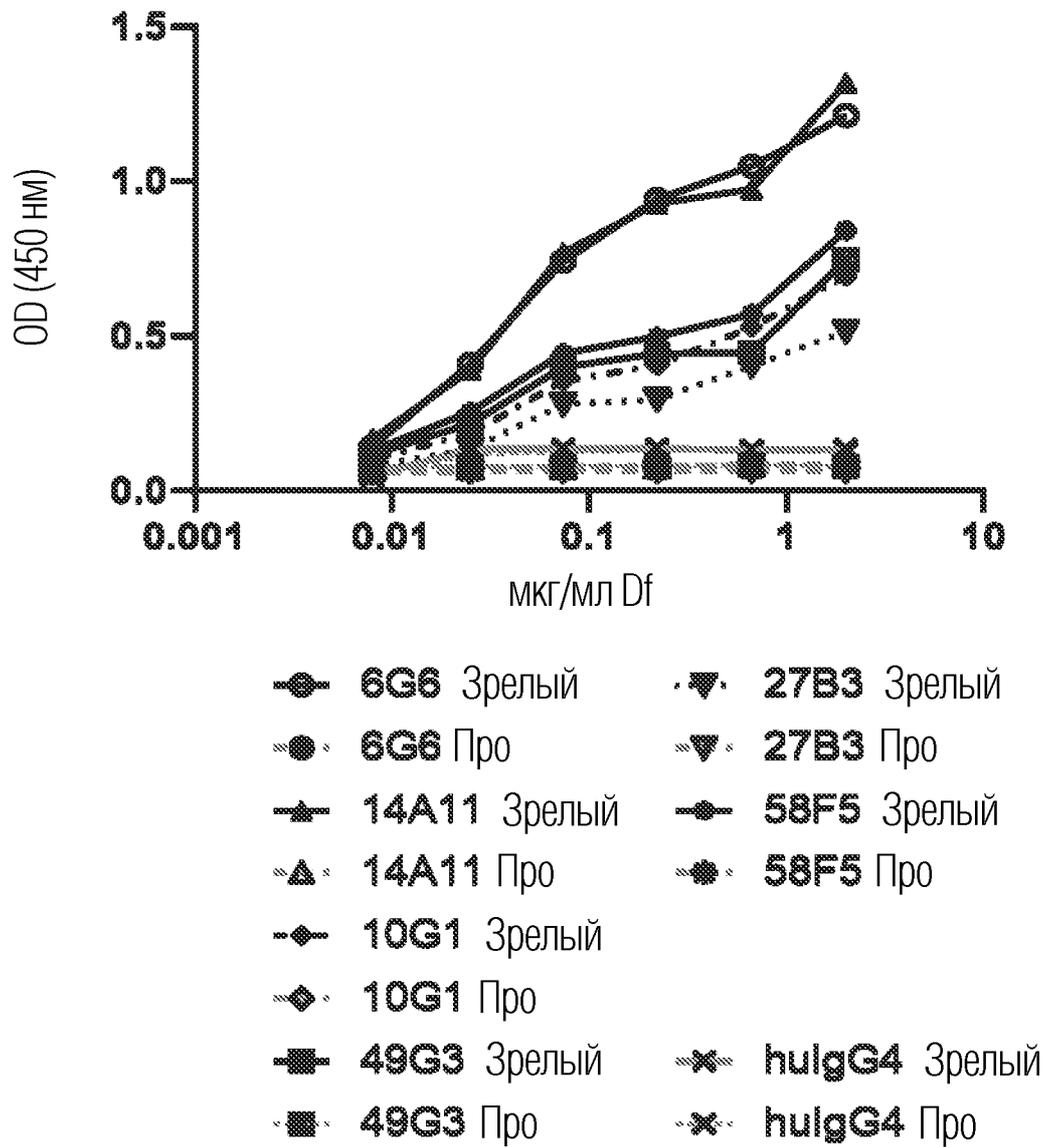
Антитела, специфичные к зрелому фактору D человека: переменная область легкой цепи

VK

Kabat и Chothia

		24	34	50	56		89	97						
6G6	DVLMTQSP	LPVSLGDQAS	IFCRSNQSI	HSNGNTYFEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLRI	SRVEAEDLGV	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:18)
14A11	DVLMTQSP	LPVSLGDQAS	IFCRSNQSI	HSNGNTYFEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:19)
27B3	DVLMTQTPL	LPVSLGDQAS	ISCRSSQSI	HSNGNTYFEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:20)
58F5	DVLMTQTPL	LPVSLGDQAS	ISCRSSQSI	HSNGNTYLEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEADDLGV	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:21)
49G3	DVLMTQTPL	LPVSLGDQAS	ISCRSSQSI	HSNGNTYFEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:22)
10G1	DVLMTQTPL	LPVSLGDQAS	ISCRSSES	HSNGNTYLEW	YLQKPGQSPK	LLIYKVS	NRFS	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YYCFQGS	HVP	PTFGGGTKLE	IKR (SIN:23)

ФИГ. 7B



ФИГ. 8



ФИГ. 9

Антитела против фактора D человека: переменная область тяжелой цепи

VH

Kabat

				31	35		50		65		95	102		
3C5	EVKLVESGGG	LVQPGGSLKL	SCATSGFTFS	<u>DYGMA</u>	WVRQA	PGKGP	EWVAF	<u>ISNLA--YSE</u>	<u>YYVDIVMGRF</u>	TISRENAKNT	LYLEMSSLRS	EDTAMYYCAR	<u>VGLYGNFFMD</u>	YWGQTSVTV SS (SIN:85)
30H2	EVKLVESGGG	LVQPGGSLKL	SCATSGFTFS	<u>DYGMA</u>	WVRQA	PGKGP	EWVAF	<u>ISNLA--YSE</u>	<u>YYVDIVMGRF</u>	TISRENAKNT	LYLEMSSLRS	EDTAMYYCAR	<u>VGLYGNFFMD</u>	YWGQTSVTV SS (SIN:85)
11H1	EVQLVESGGG	LVQPKGSLKL	SCAASGFSFN	<u>TYAMN</u>	WVRQA	PGKGLEWVAR	<u>IRSKSNNYAT</u>	<u>YYADSVKDRF</u>	TISRDDSESM	LYLQMNLRK	EDTAMYYCVR	<u>QGY--WYFD</u>	WVGTGTTVTV SS (SIN:86)	
12H10	EVQLVESGGG	LVQPKGSLKL	SCAASGFSFN	<u>TYAMN</u>	WVRQA	PGKGLEWVAR	<u>IRSKSNNYAT</u>	<u>YYADSVKDRF</u>	TISRDDSESM	LYLQMNLRK	EDTAMYYCVR	<u>HGY--WYFD</u>	WVGTGTTVTV SS (SIN:87)	
7H2	EVQVVESGGG	LVRPKGSLKL	SCAASGFSFN	<u>TYAMN</u>	WVRQA	PGKGLEWVAR	<u>IRSKSNNYAT</u>	<u>YYADSVKDRF</u>	TISRDDSESM	LSLQMNLRK	EDTAMYYCVR	<u>QGY--WYFD</u>	WVGTGTTVTV SS (SIN:88)	

ФИГ. 10А

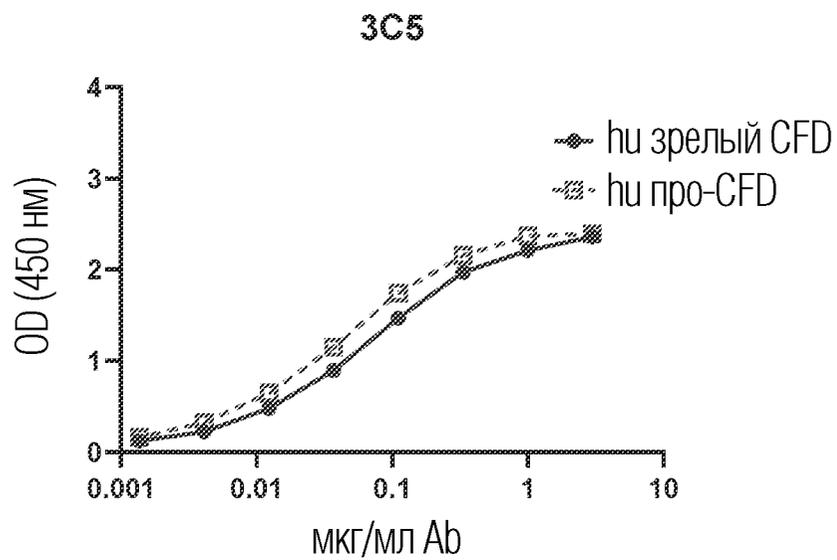
Антитела против фактора D человека: переменная область легкой цепи

VK

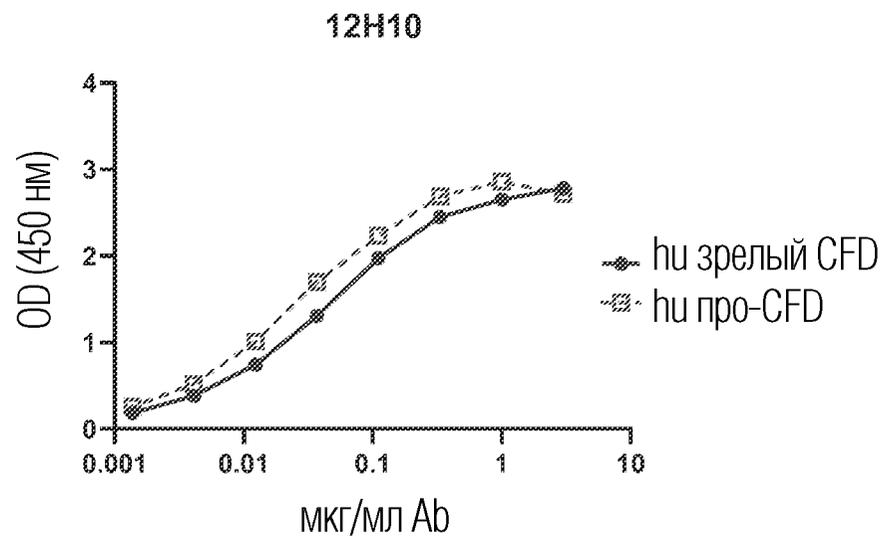
Kabat и Chothia

		24	34	50	56		69	97	
3C5	DIQMNQSPSS LSASLGDTIT	ITC <u>HASQNI</u> - - - - - <u>NVWLSW</u>	YQQKPGNIP E	LLI <u>YKASNLH</u> <u>T</u> GVPSRFSGN	ESGTSFTLTI	SSLQPEDIGT	YFC <u>QGGQSYF</u> <u>LT</u>	EGAGTKLE	LRR (S IN: 89)
30H2	DIQMNQSPSS LSASLGDTIT	ITC <u>HASQNI</u> - - - - - <u>NVWLSW</u>	YQQKPGNIP E	LLI <u>YKASNLH</u> <u>T</u> GVPSRFSGN	ESGTSFTLTI	SSLQPEDIGT	YFC <u>QGGQSYF</u> <u>LT</u>	EGAGTKLE	IKR (S IN: 90)
11H1	DVIMTQTPLS LPVSLGDQAS	ISC <u>RSSQSIY</u> <u>H</u> SNGNTYLEW	YLQKPGQSPK	LLI <u>YVSNRF</u> <u>S</u> GVPRDFSGS	GGTDFTLKI	SRVEADLGV	YYC <u>FOGSHVP</u> <u>WT</u>	EGGGTKLE	IKR (S IN: 91)
12H10	DVIMTQTPLS LPVSLGDQAS	ISC <u>RSSQSIY</u> <u>H</u> SDGNTYLEW	YLQKPGQSPK	LLI <u>YVSNRF</u> <u>S</u> GVPRDFSGS	GGTDFTLKI	SRVEADLGV	YYC <u>FOGSHVP</u> <u>YT</u>	EGGGTKLE	IKR (S IN: 92)
7H2	DVIMTQTPLS LPVSLGDQAS	ISC <u>RSSQSIY</u> <u>H</u> SNGNTYLEW	YLQKPGQSPK	LLI <u>YVSNRF</u> <u>S</u> GVPRDFSGS	GGTDFTLKI	SRVEADLGV	YYC <u>FOGSHVP</u> <u>WT</u>	EGGGTKLE	IKR (S IN: 93)

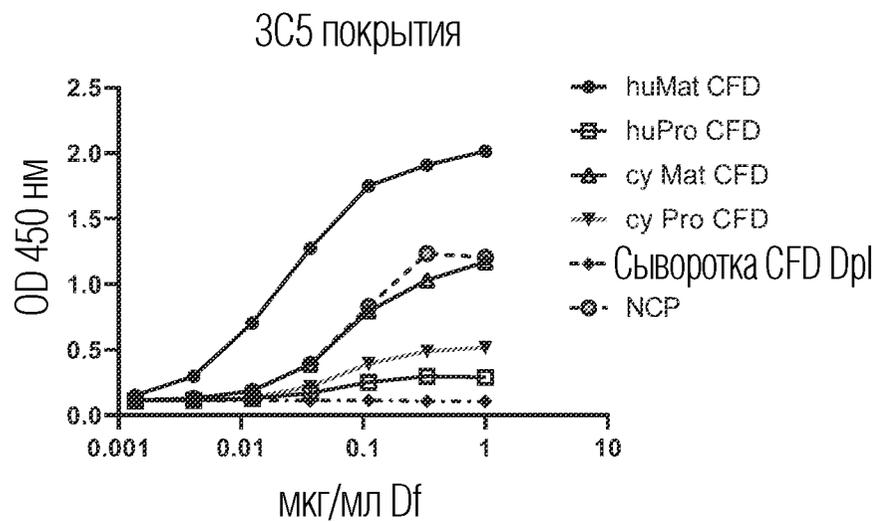
ФИГ. 10В



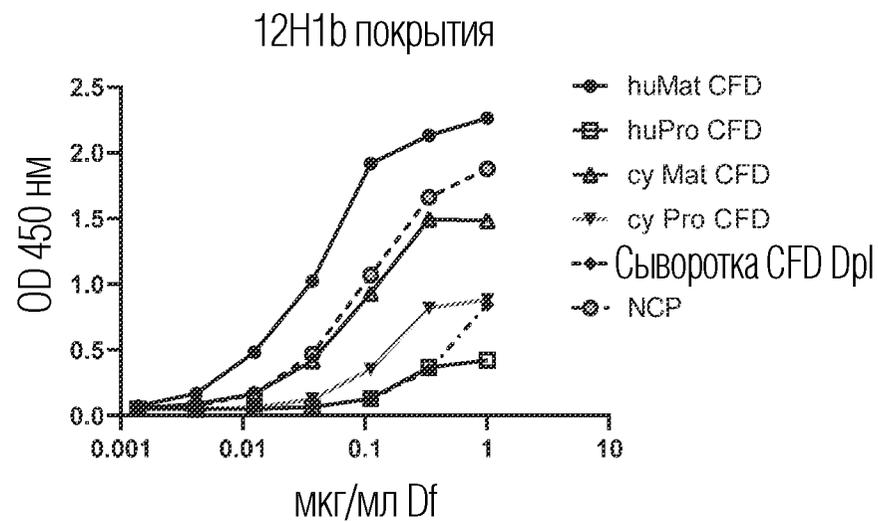
ФИГ. 11А



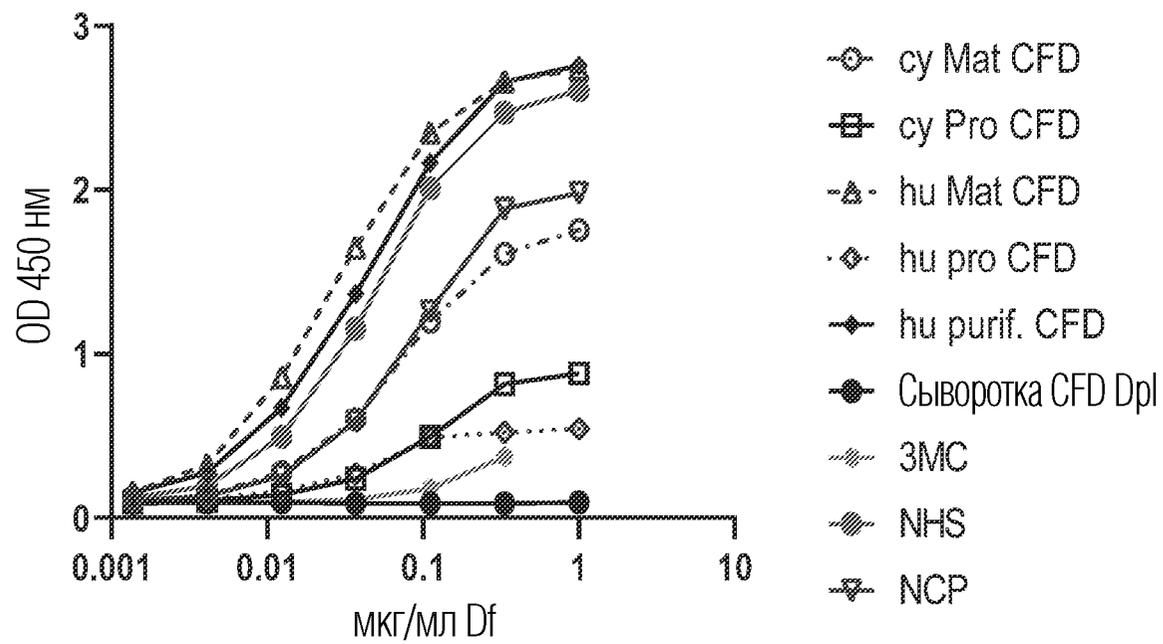
ФИГ. 11В



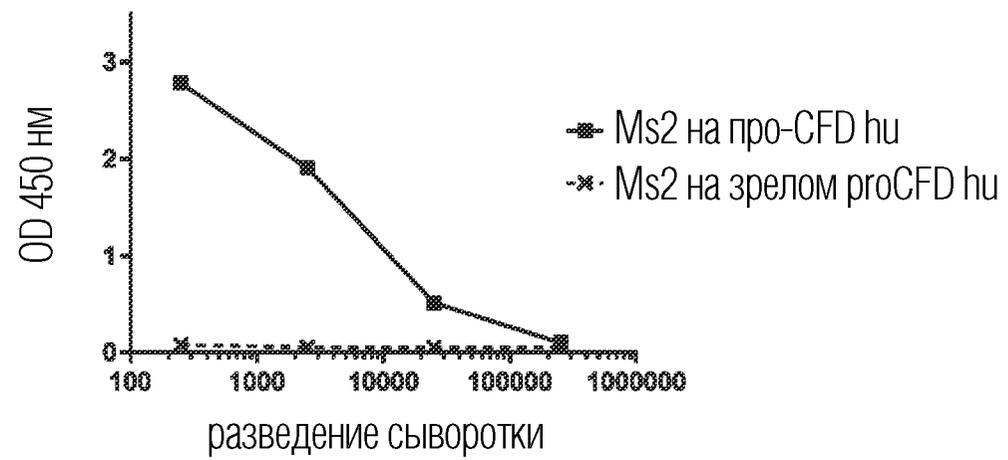
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15

Антитела, специфичные к профактору D человека: переменная область тяжелой цепи

VH

Kabat

		31	35		50	65		95	102		
18F5	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFG	-	<u>NYWMS</u> WVRQ	SPEKGLEWVA	<u>EIRLKSDNYA</u>	<u>THYAESVKGK</u>	FTISRDDS	RLYLQMN	SLR GEDTGLYYCT	N- <u>AMEAS</u> WGQ	GTLVTVSA (SIN:136)
1F9	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFG	-	<u>SYWMS</u> WVRQ	SPEKGLEWVA	<u>EIRLKSDNYA</u>	<u>AHYAESVKGK</u>	FTISRDDS	RLYLQMN	SLR GEDTGIYYCT	N- <u>AMEAS</u> WGQ	GTLVTVSA (SIN:137)
2A4	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFS	-	<u>IYWMS</u> WVRQ	SPEKGLEWVA	<u>EIRLKSDNYA</u>	<u>THYTESVKGK</u>	FTISRDDS	RLYLQMN	SLR VEDTGIYYCT	N- <u>AMEAY</u> WGQ	GTLVTVSA (SIN:138)
20A1	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCIASGFTFS	-	<u>IYWMS</u> WVRQ	SPEKGLEWVA	<u>EIRLKSENYA</u>	<u>IYYAESVKGK</u>	FIISRDDS	RLYLQMN	SLR AEDTGIYYCT	N- <u>AMEAN</u> WGQ	GTLVTVSA (SIN:139)
13A10	DVQLQESGP6 LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT	<u>SDYAMN</u>	WIRQ	FPGNKLEWVG	<u>YI--SYIGG</u>	<u>IGYNPSLKSR</u>	ISITRDTSKN	QFFLHLNSVT	TGDTATYYCA	<u>RNGAMD</u> EWGQ	GISVTVSS (SIN:140)
21H1	DVQLQESGP6 LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT	<u>SDYAMN</u>	WIRQ	FPGNKLEWVG	<u>YI--SYSGS</u>	<u>IGYSPSLKSR</u>	ISITRDTSKN	QFFLHLNSVT	TGDTATYYCA	<u>RNGAMD</u> EWGQ	GISVTVSS (SIN:141)

ФИГ. 16А

Антитела, специфичные к зрелому фактору D человека: переменная область легкой цепи

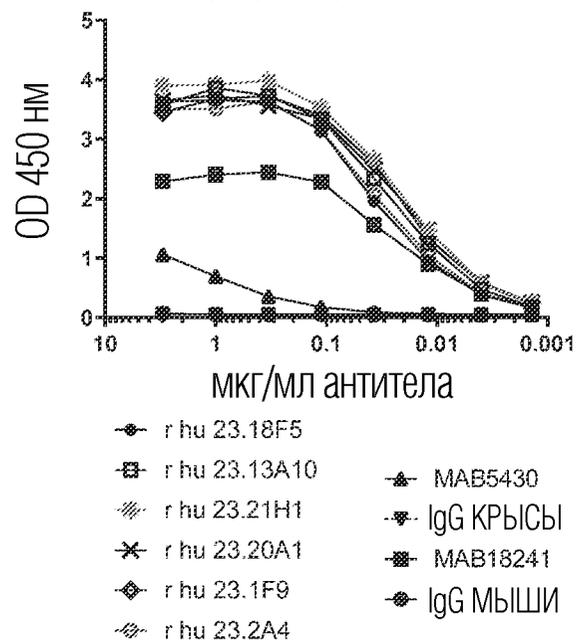
VK

Kabat и Chothia

			24	34		50	56		89	97		
18F5	DIVMSQSPSS	LAVSVGEKVT	MSC <u>MSSOSLL</u>	<u>YSKDQKNYLA</u>	WYQQKPGQSP	KLLIY <u>WASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	SGSGTDFTLT	ISSVKAEDLA	VYYC <u>LOYTY</u>	<u>PYIFGGGTKL</u>	EIKR (SIN:142)
1F9	DIVMSQSPSS	LTVSVGEKVT	MSC <u>MSSOSLL</u>	<u>YSKDQKNYLA</u>	WYQQKPGQSP	TLLIY <u>WASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	SGSGTDFTLT	ISSVKAEDLA	VYYC <u>LOYTY</u>	<u>PYIFGGGTKL</u>	EIKR (SIN:143)
2A4	DIVMSQSPSS	LAVSVGEKFT	MSC <u>KSSOSLL</u>	<u>YSRDQKNYLA</u>	WYQQKPGQSP	KLLIY <u>WASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	SGSGTDFTLT	ISSVKTEDELA	VYYC <u>LOYYSY</u>	<u>PYIFGGGTKL</u>	EIKR (SIN:144)
20A1	DIVMSQSPSS	LVVSVGEKVT	MSC <u>KSSONLL</u>	<u>YSRDQKNYLA</u>	WYQQKPGQSP	NLLIY <u>WASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	SGSGTDFSLT	ISSVKAEDLA	VYYC <u>LOYYSY</u>	<u>PYIFGGGTKL</u>	EMKR (SIN:145)
13A10	DIVLTQSPAS	LAVSLGQRAT	ISCK <u>KASOSVD</u>	<u>YDGD</u> -- <u>SYMN</u>	WYQQKPGQPP	KLLIY <u>DASNL</u>	<u>ESGIPARFSG</u>	SGSGTDFTLN	IHPVEEEDAA	TTYC <u>QOSNEA</u>	<u>PWIFGGGTKL</u>	EIRR (SIN:146)
21H1	DIVLTQSPAS	LAVSLGQRAT	ISCK <u>KASOSVD</u>	<u>YDGD</u> -- <u>SYMN</u>	WYQQKPGQPP	KLLIY <u>DASTL</u>	<u>ESGIPARFSG</u>	SGSGTDFTLN	IHPVEEEDAA	TTYC <u>QONYEA</u>	<u>PWIFGGGTKL</u>	EIKR (SIN:147)

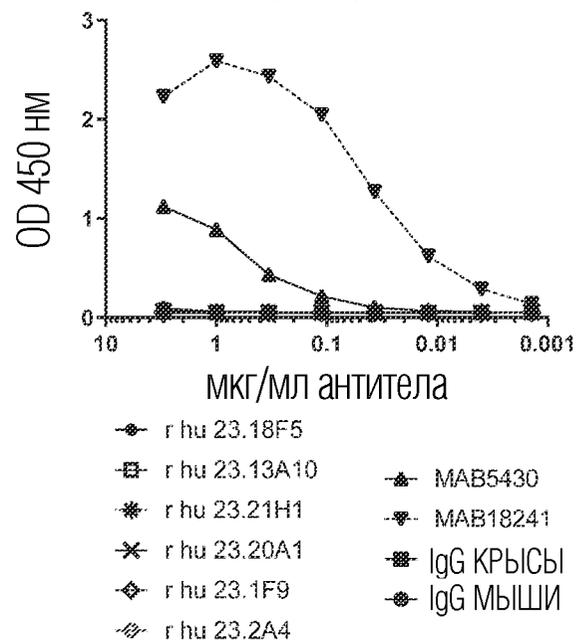
ФИГ. 16В

рекомбинантные антитела, связывающиеся с профактором D hu

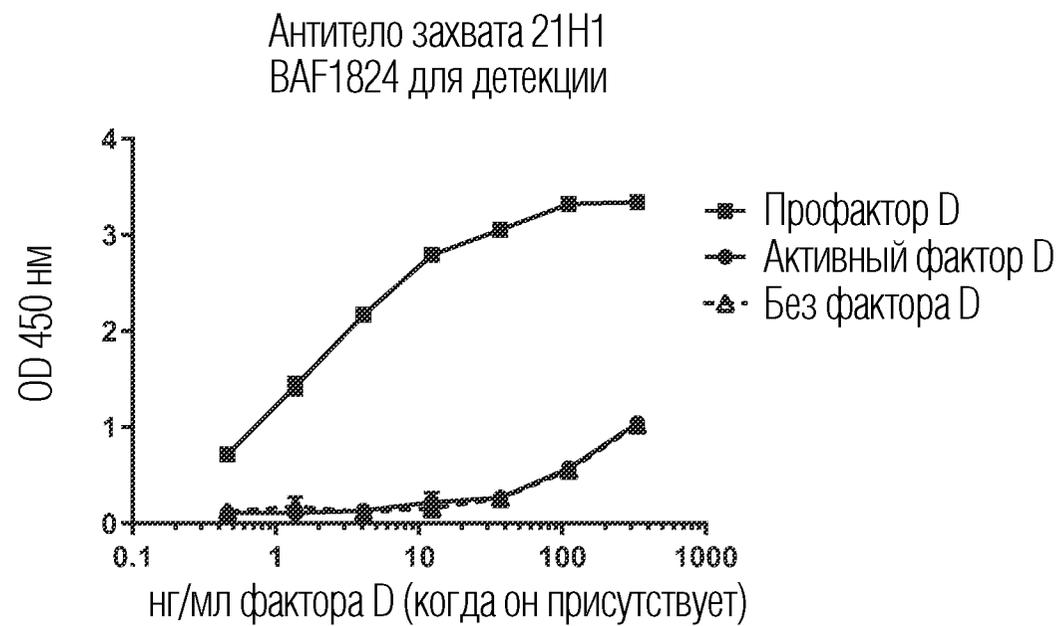


ФИГ. 17А

рекомбинантные антитела, связывающиеся со зрелым фактором D hu

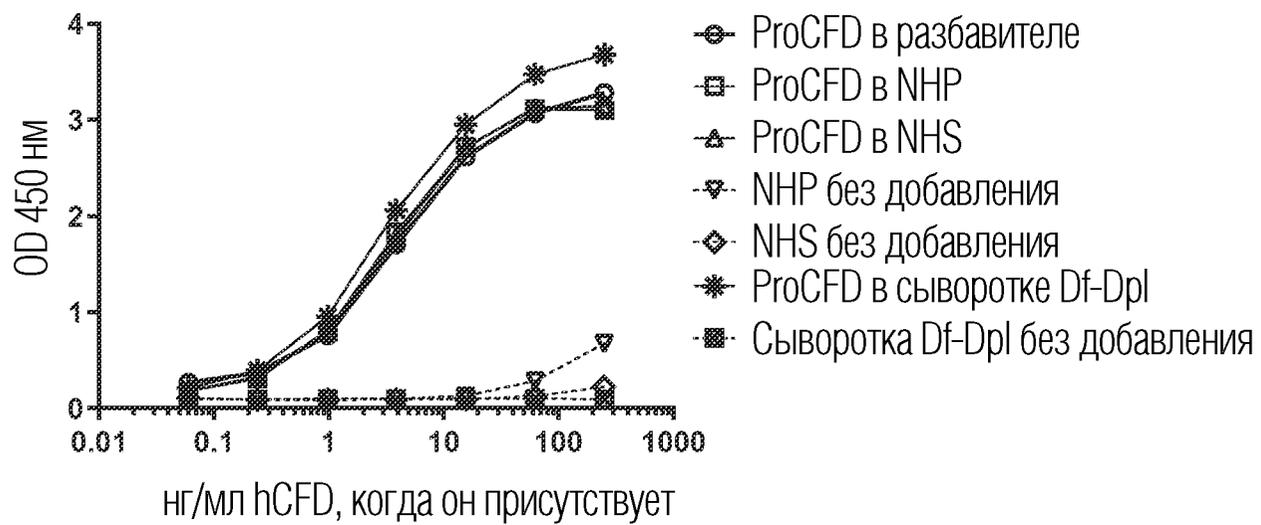


ФИГ. 17В



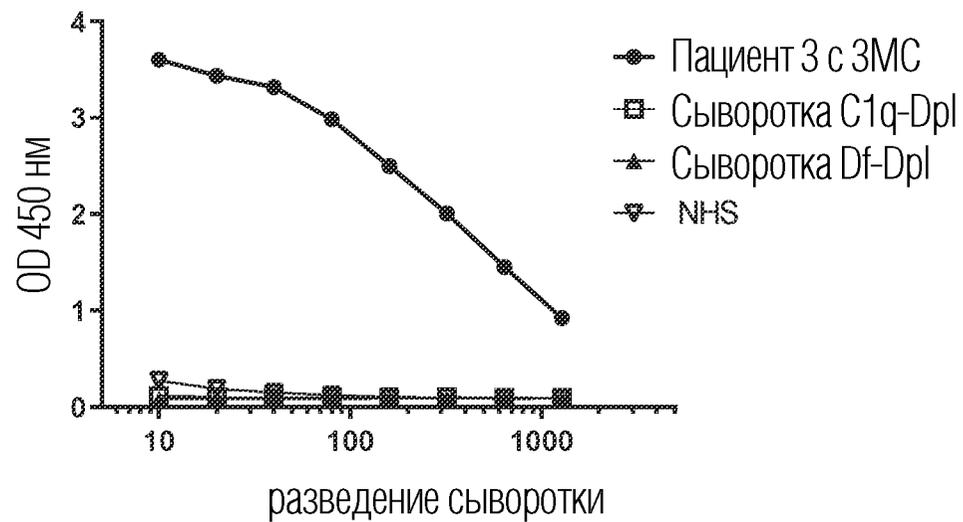
ФИГ. 18

huProCFD в сыворотке NHP, NHS или Df-Dpl 1:4

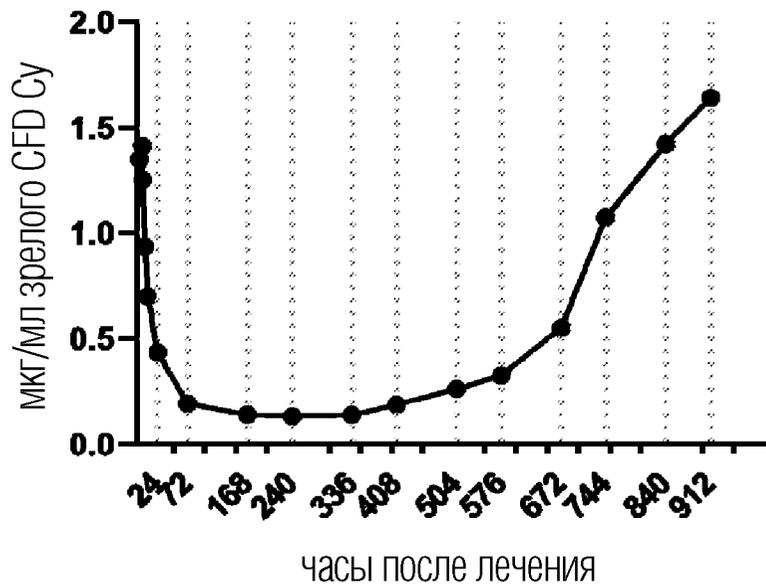


ФИГ. 19

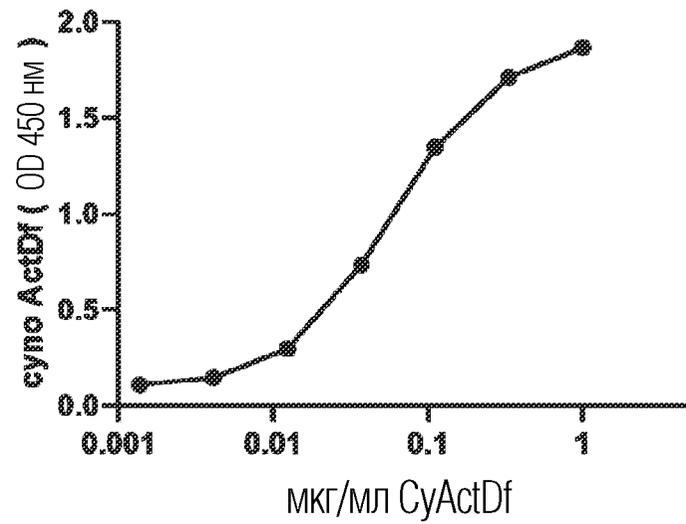
Сыворотка с истощением, нормальная и от пациента с синдромом ЗМС, протестированная в ELISA со специфичным к профактору D 21H1



ФИГ. 20

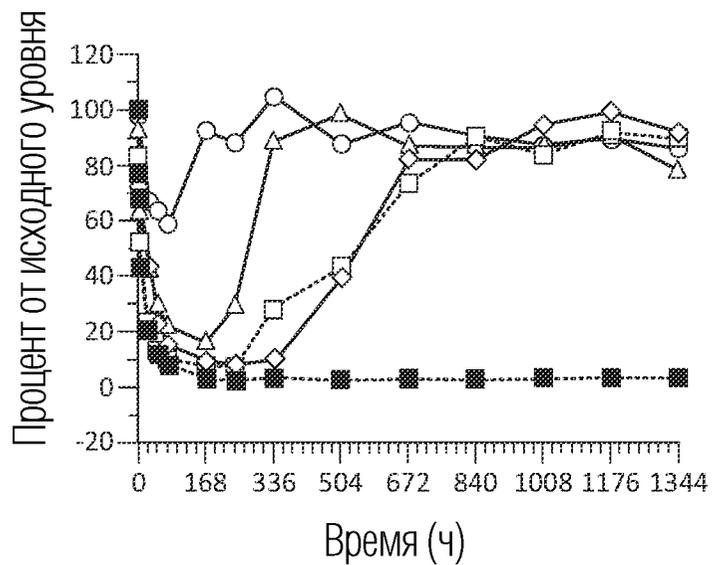


ФИГ. 21А



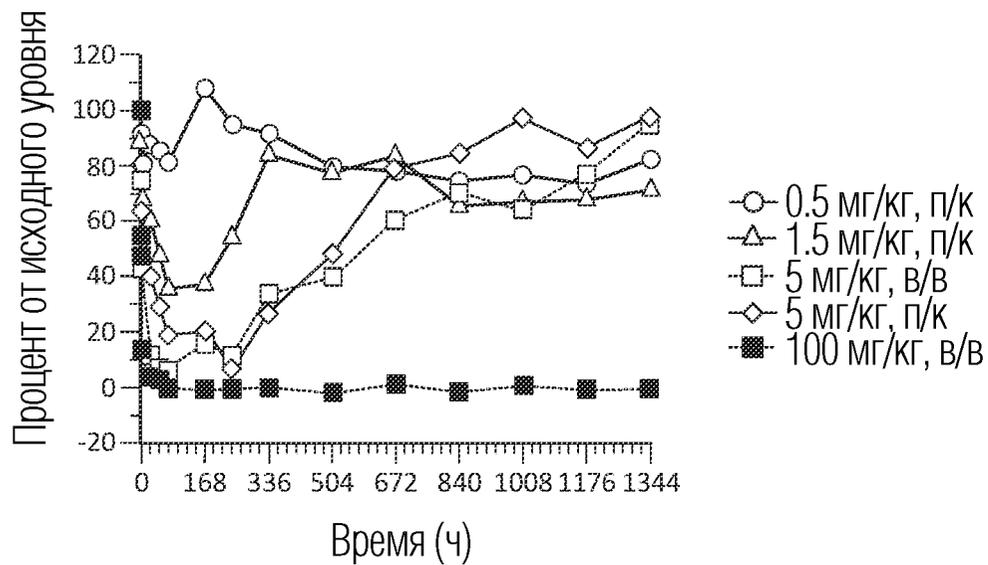
ФИГ. 21В

Зрелый CFD

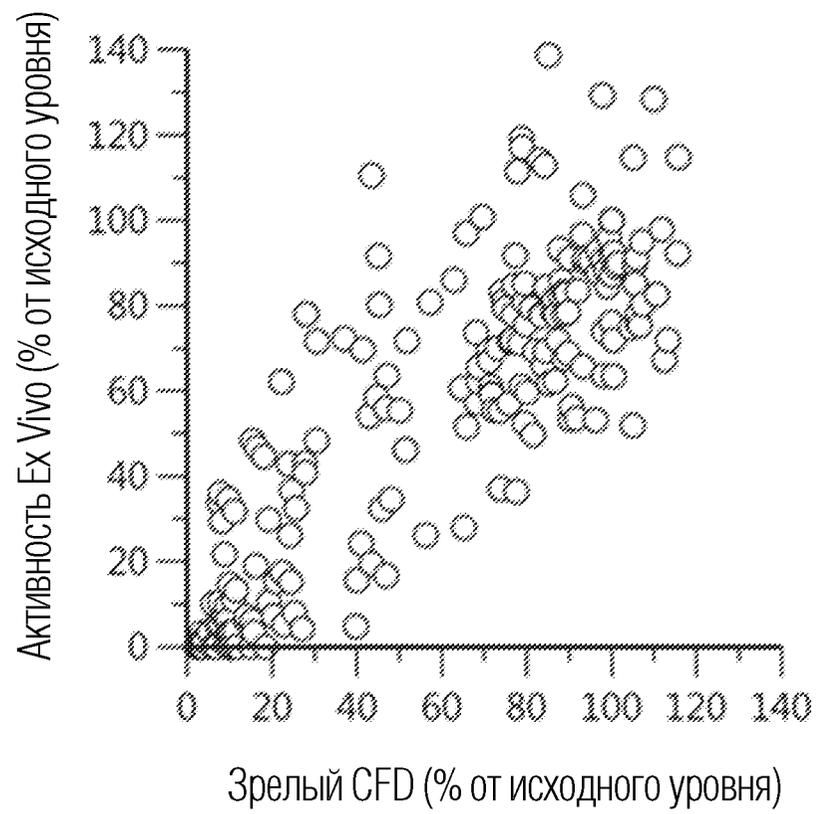


ФИГ. 22А

Активность AP Ex Vivo

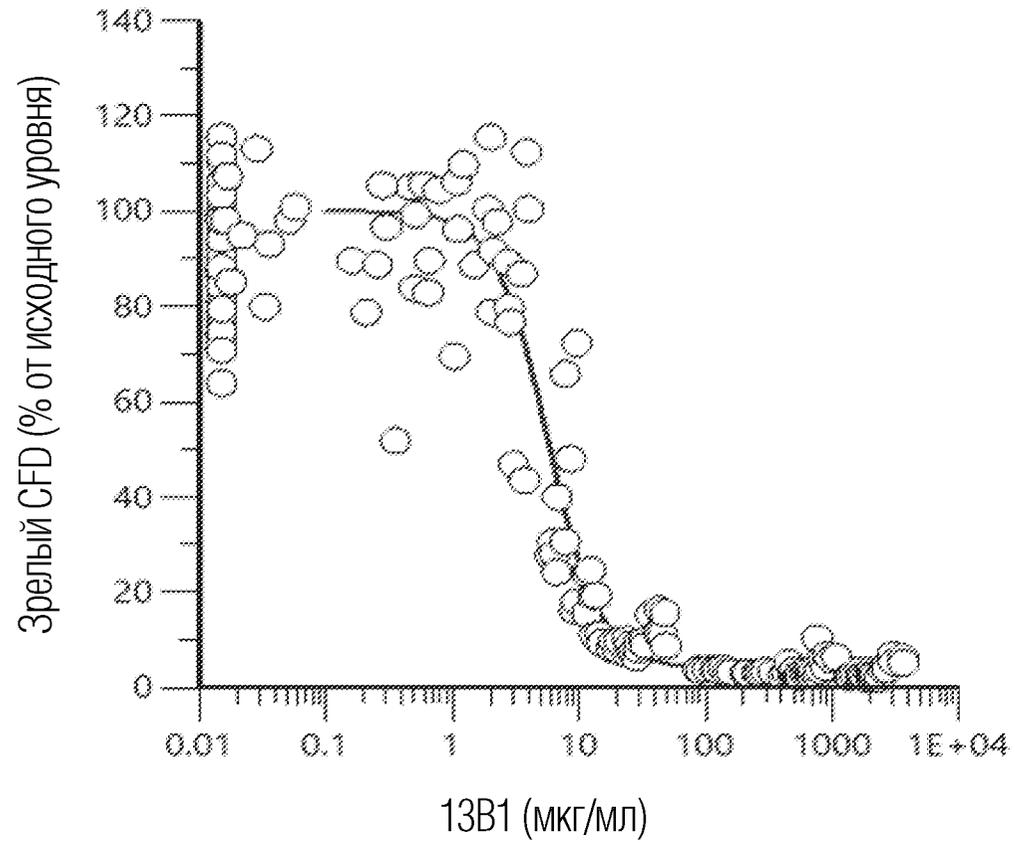


ФИГ. 22В

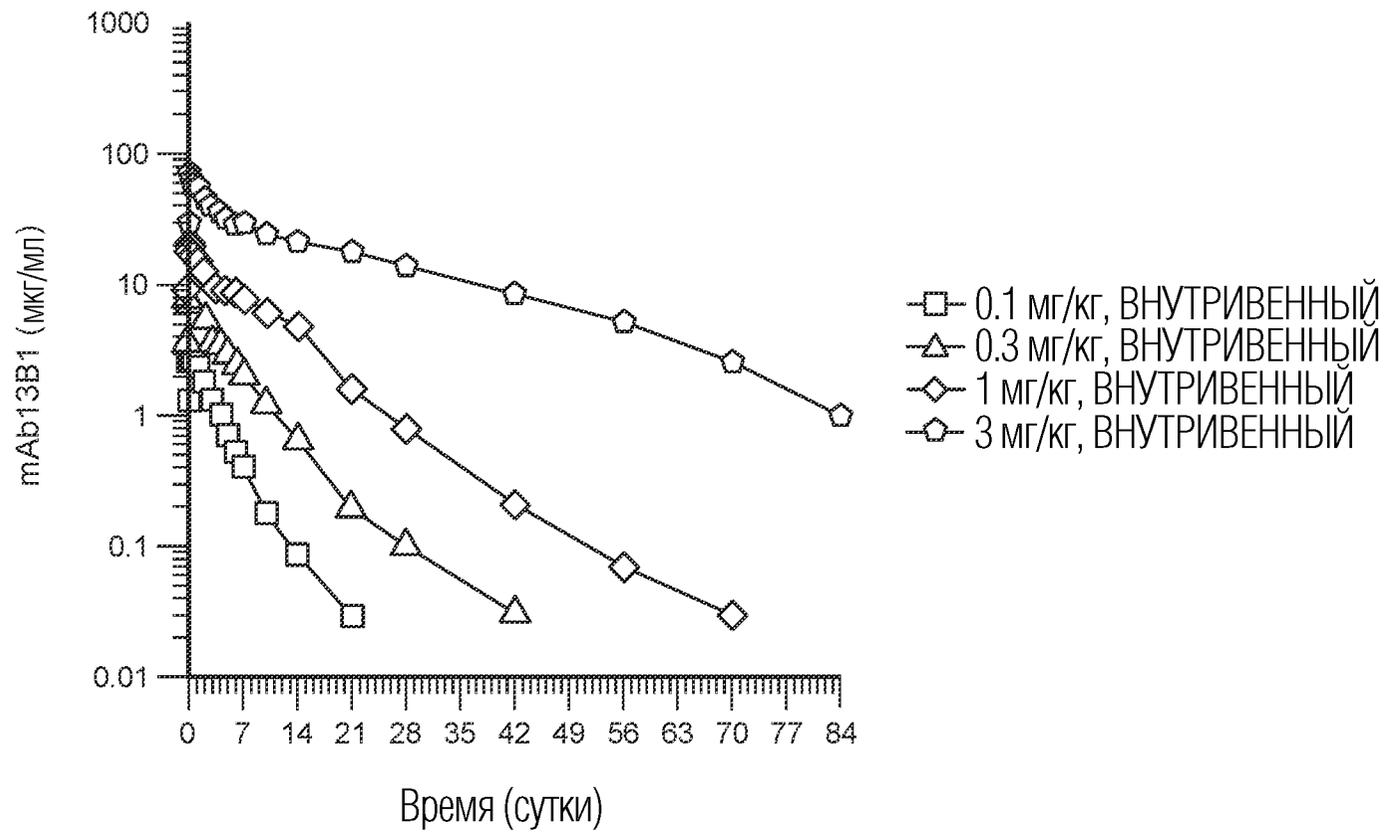


ФИГ. 23

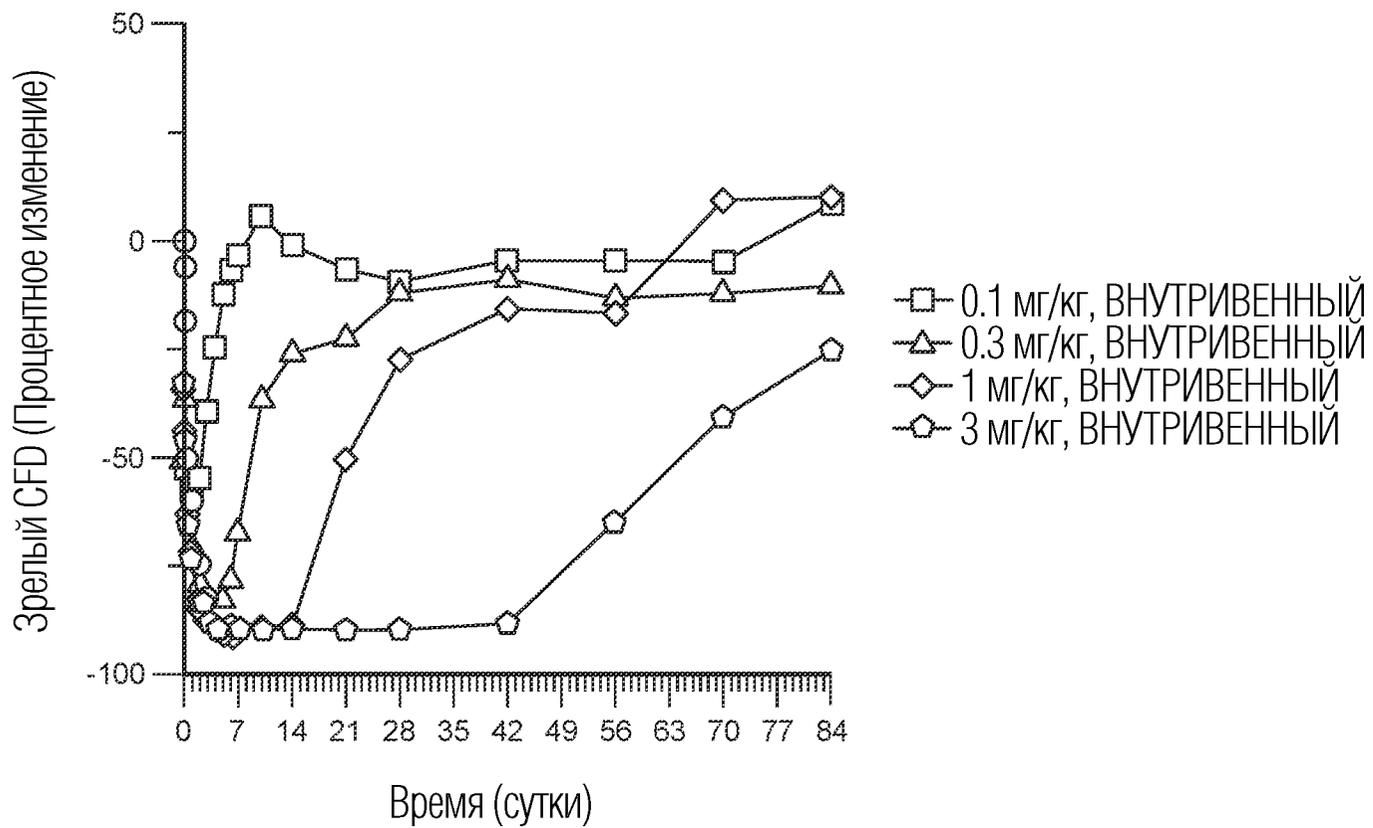
PK - PD



ФИГ. 24



ФИГ. 25А



ФИГ. 25В