(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392176 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.05

(22) Дата подачи заявки
2022.02.04

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

(54) БИОМАРКЕР ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТРОГО COVID-19 И ПОСТОСТРОГО COVID-19

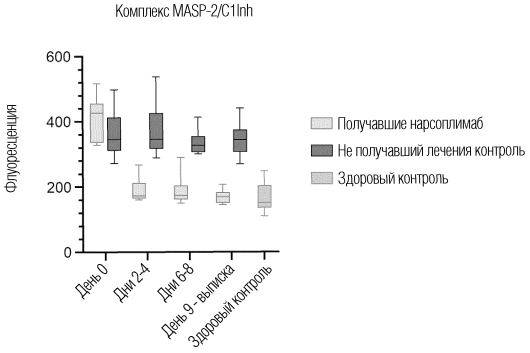
(31) **63/146,479; 63/277,361**
(32) **2021.02.05; 2021.11.09**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/015303**
(87) **WO 2022/170090 2022.08.11**

(71) Заявитель:
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Демопулос Грегори А., Дадлер Томас (US), Линч Николас Джеймс, Швебле Ханс-Вильхельм (GB), Шеффер Кэтлин, Ябуки Мунехиса (US)

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

(57) В настоящем документе раскрыты композиции, наборы и способы для определения концентрации растворимого комплекса MASP-2/C1-INH в биологической жидкости, такой как биологическая жидкость, полученная у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2. Также раскрыты способы применения указанных композиций, способов и наборов для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH с целью определения состояния активации лектинового пути у субъекта-млекопитающего и, таким образом, для оценки риска развития у субъекта, который инфицирован или был инфицирован SARS-CoV-2, ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода, или определения необходимости лечения или эффективности лечения субъекта, нуждающегося в этом, с применением ингибитора комплемента, такого как MASP-2-ингибирующее средство.



202392176 A1

202392176 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578726EA/042

БИОМАРКЕР ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТРОГО COVID-19 И ПОСТОСТРОГО COVID-19

ЗАЯВЛЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, связанный с настоящей заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен посредством отсылки в описание. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, называется MP_1_0319_PCT_Sequence_Listing_20220131_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер 147 КБ; был создан 1 февраля 2022 года и представлен по сети EFS при подаче настоящего описания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента обеспечивает механизм раннего действия для инициации, усиления и управления иммунным ответом при микробной инфекции и других острых повреждениях (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, в Fundamental Immunology, Third Edition, под ред. W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York), у человека и других позвоночных. Хотя активация комплемента обеспечивает важную защиту первой линии от потенциальных патогенов, активность комплемента, которая способствует защитному иммунному ответу, также может представлять потенциальную угрозу для организма (K.R. Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol. 75:417-431, 1994; B.P.Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Например, продукты протеолиза C3 и C5 рекрутируют и активируют нейтрофилы. Хотя активированные нейтрофилы крайне важны для иммунной защиты, они неизбирательно выделяют расщепляющие ферменты и могут вызывать повреждение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать отложение литических компонентов комплемента на ближайших клетках организма, также как на микробных мишенях, что приводит к лизису собственных клеток.

В настоящее время общепризнано, что система комплемента может быть активирована тремя различными путями: классическим путем, лектиновым путем и альтернативным путем. Классический путь обычно инициируется комплексом, состоящим из антител организма-хозяина, связанных с чужеродной частицей (т.е. антигеном), и поэтому требует предварительного контакта с антигеном для формирования специфического гуморального ответа. Поскольку активация классического пути зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа организма-хозяина, классический путь является частью приобретенной иммунной системы. В отличие от этого, лектиновый и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунитета и являются частью врожденной иммунной системы.

Широко распространено мнение, что лектиновый путь играет важную роль в иммунной защите от инфекции у интактного организма. Убедительные доказательства участия МСЛ в иммунной защите были получены при анализе у пациентов с пониженными уровнями функционального МСЛ в сыворотке крови (Kilpatrick, Biochim.

Biophys. Acta 1572:401-413, (2002)). Такие пациенты проявляют предрасположенность к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Эти симптомы обычно проявляются в раннем возрасте, во время очевидного окна уязвимости, когда титр материнских антител падает, но еще не успевает сформироваться полный репертуар ответов антител. Такой синдром часто возникает в результате мутаций в нескольких участках коллагеновой части МСЛ, которые препятствуют правильному образованию олигомеров МСЛ. Впрочем, поскольку МСЛ может функционировать как опсонин независимо от комплемента, неизвестно, в какой степени повышенная восприимчивость к инфекции обусловлена нарушением активации комплемента.

Считалось, что все три пути (то есть классический, лектиновый и альтернативный) сходятся на компоненте С5, который расщепляется с образованием продуктов с различными провоспалительными эффектами. Конвергентный путь называют терминальным путем комплемента. С5а является наиболее мощным анафилатоксином, вызывающим изменения тонуса гладкой мускулатуры и сосудов, а также проницаемости сосудов. Он также является мощным хемотаксином и активатором как нейтрофилов, так и моноцитов. С5а-опосредованная клеточная активация может значительно усиливать воспалительные реакции, вызывая высвобождение множества дополнительных медиаторов воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и активные формы кислорода. Расщепление С5 приводит к образованию С5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (МАК). В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что сублитическое отложение МАК может играть важную роль в воспалении в дополнение к его роли в качестве литического порообразующего комплекса.

Помимо своей важной роли в иммунной защите, система комплемента способствует повреждению тканей при различных клинических состояниях. Хотя имеется большое количество данных, свидетельствующих о вовлечении как классического, так и альтернативного путей комплемента в патогенез неинфекционных заболеваний человека, роль лектинового пути только начинают оценивать. Недавние исследования предоставили подьверждения того, что активация лектинового пути может отвечать за активацию комплемента и связанное с этим воспаление при ишемическом/реперфузионном повреждении. Коллард с соавт. (Collard et al., 2000) сообщали, что культивируемые эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связывают МСЛ и демонстрируют отложение С3 при контакте с человеческой сывороткой (Collard et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556, (2000)). Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими моноклональными антителами против МСЛ ингибировала связывание МСЛ и активацию комплемента. Эти результаты также были получены в модель ишемии-реперфузии миокарда на крысах, в которой крысы, получавшие блокирующее антитело, направленное против крысиного МСЛ, демонстрировали значительно меньшее повреждение миокарда при окклюзии коронарной артерии, чем крысы, получавшие контрольное антитело (Jordan et al., Circulation 104:1413-1418, (2001)). Молекулярный

механизм связывания МСЛ с эндотелием сосудов после окислительного стресса неясен; недавнее исследование указывает, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием МСЛ с цитокератинами эндотелия сосудов, а не с гликоконъюгатами (Collard et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, (2001)). Другие исследования указывают на участие классических и альтернативных путей в патогенезе ишемического/реперфузионного повреждения, при этом роль лектинового пути в этом заболевании остается спорной (Riedermann, N.C., et al., Am. J. Pathol. 162:363-367, 2003).

Фиброз представляет собой образование избыточной соединительной ткани в органе или ткани, обычно в ответ на повреждение или травму. Характерным признаком фиброза является образование избыточного внеклеточного матрикса после локальной травмы. Нормальный физиологический ответ на травму приводит к отложению соединительной ткани, однако этот первоначально полезный репаративный процесс может сохраняться и становиться патологическим, приводя к изменению архитектуры и функцию ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты, что приводит к сокращению матрикса, повышенной ригидности, микрососудистой компрессии и гипоксии. Приток воспалительных клеток, включая макрофаги и лимфоциты, приводит к высвобождению цитокинов и усиливает отложение коллагена, фибронектина и других молекулярных маркеров фиброза. Стандартные терапевтические подходы в основном были направлены на воспалительный процесс фиброза с применением кортикостероидов и иммунодепрессантов. К сожалению, эти противовоспалительные средства практически не показали клинического эффекта. В настоящее время не существует эффективных методов лечения или терапии фиброза, однако и исследования на животных, так и отдельные сообщения о результатах исследований с участием человека позволяют предположить, что повреждение фиброзной ткани можно нейтрализовать (Tampe and Zeisberg, Nat Rev Nephrol, Vol 10:226-237, 2014). Почка имеет ограниченную способность к восстановлению после повреждения. Различные патологии почек приводят к локальному воспалению, вызывающему рубцевание и фиброз почечной ткани. Сохранение воспалительных стимулов приводит к тубулоинтерстициальному воспалению и фиброзу, а также к прогрессирующему нарушению функции почек при хроническом заболевании почек. Его прогрессирование до терминальной стадии почечной недостаточности связано со значительной заболеваемостью и смертностью. Поскольку тубулоинтерстициальный фиброз является общей конечной точкой многих патологий почек, он представляет собой ключевую мишень для терапии, направленной на предотвращение почечной недостаточности. Факторы риска (например, протеинурия), независимые от первичного заболевания почек, способствуют развитию фиброза почек и потере выделительной функции почек, вызывая локальное воспаление, которое, в свою очередь, усиливает прогрессирование заболевания.

Принимая во внимание роль фиброза при многих заболеваниях и нарушениях,

таких как, например, тубулоинтерстициальный фиброз, приводящий к хроническому заболеванию почек, существует острая необходимость в разработке терапевтически эффективных средств для лечения заболеваний и состояний, вызванных или осложняемых фиброзом. Кроме того, вследствие нехватки новых и существующих методов лечение, направленных на воспалительные профибротические пути при заболеваниях почек, существует необходимость в разработке терапевтически эффективных средств для лечения, подавления, предотвращения и/или устранения фиброза почек и, таким образом, предотвращения прогрессирования хронического заболевания почек.

Коронавирусная инфекция 2019 года (COVID-19) представляет собой инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (коронавирусом SARS 2 или SARS-CoV-2), вирусом, близко родственным вирусу SARS (World Health Organization, 2/11/2020, Novel Coronavirus Situation Report 22). У лиц, инфицированных COVID-19, может наблюдаться повышенная температура тела, сухой кашель, усталость и одышка. Случаи могут прогрессировать до дыхательной дисфункции, включая пневмонию, тяжелый острый респираторный синдром и смерть в группе наиболее уязвимых лиц (см., например, Hui D.S. et al., Int JInfect Dis 91:264-266, Jan 14, 2020). Вакцины или специфической противовирусной терапии не существует, лечение включает симптоматическую и поддерживающую терапию.

Грипп (также известный как "инфлюэнца") - инфекционное заболевание, вызываемое РНК-содержащим вирусом гриппа. Симптомы заражения вирусом гриппа могут варьировать от легких до тяжелых и могут включать повышенную температуру, насморк, боль в горле, боль в мышцах и суставах, головную боль, кашель и чувство усталости. Эти симптомы обычно появляются через два дня после контакта с вирусом и в большинстве случаев длятся меньше недели, однако кашель может сохраняться более двух недель (см. "Influenza Seasonal", World Health Organization 6 November 2018). Осложнения гриппа могут включать: вирусную пневмонию, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), вторичную бактериальную пневмонию, инфекции носовых пазух и ухудшение существующих нарушений состояния здоровья, таких как астма или сердечная недостаточность (см. "Key Facts About Influenza (Flu)" Centers for Disease Control and Prevention (CDC), September 9, 2014). Последствия гриппа намного серьезнее и длятся дольше, чем последствия обычной простуды. Большинство людей полностью выздоравливают примерно через одну-две недели, однако у других развиваются угрожающие жизни осложнения, такие как пневмония. Таким образом, грипп может приводить к смерти, особенно в случае ослабленных, молодых и пожилых, лиц с ослабленной иммунной системой или хроническими заболеваниями. См. Hilleman MR, Vaccine. 20 (25-26): 3068-87 (2002).

Человека поражают три из четырех типов вирусов гриппа: тип A, тип B и тип C. Отсутствуют сведения о том, что D инфицирует человека, однако считается, что это возможно (см. "Novel Influenza D vims: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics", Virulence. 8 (8): 1580-91, 2017) Серотипами гриппа A, которые были

подтверждены у людей, являются: H1N1 (вызвавший пандемии "испанского гриппа" в 1918 году и "свиного гриппа" в 2009 году), H2N2 (вызвавший пандемию "азиатского гриппа" в 1957 году), H3N2 (вызвавший пандемию "гонконгского гриппа" в 1968 году), H5N1 (вызвавший пандемию "птичьего гриппа" в 2004 году), H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9 и H6N1. См. World Health Organization (30 June 2006). "Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection", Wkly Epidemiol Rec. 81 (26): 249-57.; Fouchier RA, et al. (2004) PNAS 101 (5): 1356-61; Wkly Epidemiol Rec. 83 (46): 415-20, Asian Lineage Avian Influenza A(H7N9) Virus, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 7 December 2018).

Общие симптомы вируса гриппа (также известного как инфлюэнца), такие как повышенная температура тела, головные боли и усталость, являются результатом больших количеств провоспалительных цитокинов и хемокинов (таких как интерферон или фактор некроза опухоли), секретируемых инфицированными вирусом гриппа клетками. См. Eccles R. et al., Lancet Infect Dis 5(11):718-25 (2005), Schmitz N, et al.. Journal of Virology. 79 (10): 6441-8 (2005). Такой массивный иммунный ответ может привести к угрожающему жизни цитокиновому шторму. Было высказано предположение, что такой эффект является причиной необычной летальности как птичьего гриппа H5N1, так и пандемического штамма 1918 года (Cheung CY, et al., Lancet. 360 (9348): 1831-37 (2002); Kash JC, et al., Nature. 443 (7111): 578-81 (2006)). Грипп также вызывает программируемую клеточную смерть (апоптоз), см. Spiro SG, et al., Clinical Respiratory Medicine, Elsevier Health Sciences, p. 311 (2012). Таким образом, существует острая необходимость в разработке терапевтически эффективных средств для лечения, подавления и/или профилактики вызванной коронавирусом пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома, а также вызванной вирусом гриппа пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома.

Кроме того, для достижения максимального успеха в лечении и обеспечения защиты людей от COVID-19 существует острая необходимость в биомаркерах и высокоточных тестах для выявления лиц, подверженных риску развития острого COVID-19 и/или длительного заболевания (постострого COVID-19, также известного как синдром долгого COVID-19), или развитии защитного иммунного ответа против синдрома COVID-19. Также необходимы тесты для определения эффективности терапевтических средств для лечения и/или предотвращения развития осложнений, связанных с COVID-19, у субъектов, инфицированных SARS-CoV-2, включая лиц, страдающих долгим COVID-19 или подвергающихся риску его развития.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Это краткое описание сущности изобретения представлено для ознакомления с набором концепций в упрощенной форме, которые дополнительно описаны ниже в Подробном описании. Этот раздел не предназначен для определения ключевых характеристик заявленного изобретения и не предназначен для использования при определении объема заявленного изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома, пневмонии или некоторого другого легочного или другого острого проявления COVID-19, такого как тромбоз, у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2, включающий: (i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с контрольным образцом здорового субъекта или другим референсным стандартом указывает на повышенный риск развития одного или больше острых проявлений COVID-19; и (ii) введение субъекту, имеющему повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH, некоторого количества ингибитора MASP-2, эффективно ингибирующего MASP-2-зависимую активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает одним или больше респираторными симптомами, и способ включает введение субъекту некоторого количества ингибитора MASP-2, эффективно улучшающего по меньшей мере один респираторный симптом (т.е. улучшающего дыхательную функцию). В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой антитело к MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 селективно ингибирует активацию комплемента по лектиновому пути, по существу без ингибирования C1q-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой малую молекулу, такую как синтетическая или полусинтетическая малая молекула, ингибирующая MASP-2-зависимую активацию комплемента. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 является ингибитором экспрессии MASP-2. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфично связывается с MASP-2 человека. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело по существу не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует депонирование C3b в 90% человеческой сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность,

представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, улучшения, предотвращения или снижения риска развития одного или больше связанных с COVID-19 долгосрочных осложнений у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2, включающий: (i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с контрольным образцом здорового субъекта указывает на повышенный риск развития одного или больше связанных с COVID-19 долгосрочных осложнений; и (ii) введение субъекту, имеющему повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH, некоторого количества ингибитора MASP-2, эффективно ингибирующего MASP-2-зависимую активацию комплемента. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой антитело к MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 селективно ингибирует активацию комплемента по лектиновому пути, по существу без ингибирования C1q-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 представляет собой малую молекулу, такую как синтетическая или полусинтетическая малая молекула, которая ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 является ингибитором экспрессии MASP-2. В одном варианте осуществления ингибирующее антитело MASP-2 представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, который специфично связывается с MASP-2 человека. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело по существу не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует депонирование C3b в 90% человеческой сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено моноклональное антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где антитело включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:87, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:88. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечен детектируемой группой, например детектируемой группой, подходящей для использования в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент иммобилизованы на подложке, такой как подложка, подходящая для использования в иммуноанализе, таком как иммуноанализ для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где антитело включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:98. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены детектируемой группой, например детектируемой группой, подходящей для использования в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент иммобилизованы на подложке, такой как подложка, подходящая для использования в иммуноанализе, таком как иммуноанализ для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ измерения количества MASP-2/C1-INH в биологическом образце, включающий: (a) получение исследуемого биологического образца у субъекта-человека; (b) проведение иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, где комплекс MASP-2/C1-INH захватывается моноклональным

антителом, которое специфично связывается с MASP-2 человека; и комплекс MASP-2/C1-INH обнаруживают напрямую или ненапрямую с помощью антитела, которое специфично связывается с C1-INH; и (c) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженного в соответствии с (b), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженного в исследуемом образце, указывает на степень активации комплемента по лектиновому пути. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой образец жидкости субъекта-человека, выбранной из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мочи и спинномозговой жидкости. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек в настоящее время инфицирован SARS-CoV-2 или был ранее инфицирован SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ определения риска развития у субъекта, который инфицирован или был инфицирован SARS-CoV-2, связанного с COVID-19 ОРДС или долгосрочного осложнения, ассоциированного с COVID-19, включающий: (a) получение биологического образца у субъекта; (b) измерение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в образце; (c) сравнение измеренного уровня с заданным уровнем комплекса MASP-2/C1-INH или референсным стандартом для оценки риска развития связанного с COVID-19 ОРДС и/или долгосрочного осложнения, ассоциированного с COVID-19; и (d) определение риска развития у субъекта Связанного с COVID-19 ОРДС и/или долгосрочного осложнения, ассоциированного с COVID-19, и предоставление результатов пациенту, врачу или в базу данных; (e) необязательно, назначение лечения субъекту, у которого выявлен риск развития острого заболевания и/или долгосрочного осложнения, ассоциированного с инфекцией COVID-19. В некоторых вариантах осуществления уровень комплекса MASP-2/C1-INH измеряют в иммуноанализе. В некоторых вариантах осуществления этап (b) включает проведение иммуноанализа, такого как ИФА, с целью измерения уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ включает использование антитела, специфично связывающего с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87 и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, где CDR-области

пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ включает использование антитела, которое специфично связывается с MASP-2 и включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ контроля эффективности лечения MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом, где способ включает: (a) введение дозы MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту-млекопитающему в первом моменте времени; (b) оценку первого уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (a); (c) лечение субъекта MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом во втором моменте времени; (d) оценку второго уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (c); и (e) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, определенного в этапе (b), с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH, определенным в этапе (d), для определения эффективности MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек, страдающий или подвергающийся риску развития COVID-19 или долгосрочного осложнения, ассоциированного с COVID-19. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек, страдающий или подвергающийся риску развития заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из ТГСК-ТМА, IgAN, волчаночного нефрита и реакции "трансплантат против хозяина" или некоторого другого заболевания или нарушения, связанного с лектиновым путем. В некоторых вариантах осуществления уровень комплекса MASP-2/C1-INH измеряют в иммуноанализе. В некоторых вариантах осуществления этап (b) включает проведение иммуноанализа, такого как ИФА, с целью измерения уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ включает использование антитела, которое специфично связывается с MASP-2 и включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, где CDR-области пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ включает использование антитела, которое специфично связывается с MASP-2 и включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области

пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата.

Описание чертежей

Предыдущие аспекты и многие из соответствующих преимуществ данного изобретения станут более ясны благодаря их лучшему пониманию при обращении к следующему подробному описанию, рассматриваемому в сочетании с прилагаемыми чертежами, где:

ФИГУРА 1 - диаграмма, иллюстрирующая геномную структуру MASP-2 человека;

ФИГУРА 2A - схематическая диаграмма, иллюстрирующая доменную структуру белка MASP-2 человека;

ФИГУРА 2B - схематическая диаграмма, иллюстрирующая доменную структуру белка MAp19 человека;

ФИГУРА 3 - диаграмма, иллюстрирующая стратегию нокаута MASP-2 мыши;

ФИГУРА 4 - диаграмма, иллюстрирующая мини-генную конструкцию MASP-2 человека;

На ФИГУРЕ 5A представлены результаты, демонстрирующие, что дефицит MASP-2 приводит к потере опосредованной лектиновым путем активации C4, измеряемой по отсутствию депонирования C4b на маннане, как описано в Примере 2;

На ФИГУРЕ 5B представлены результаты, демонстрирующие, что дефицит MASP-2 приводит к потере опосредованной лектиновым путем активации C4, измеряемой по отсутствию депонирования C4b на зимосане, как описано в Примере 2;

На ФИГУРЕ 5C представлены результаты, демонстрирующие относительные уровни активации C4 образцов сыворотки, полученных из MASP-2+/-; MASP-2-/- и линий дикого типа, в качестве показателя депонирования C4b на маннане и на зимозане, как описано в Примере 2;

На ФИГУРЕ 6 представлены результаты, демонстрирующие, что добавление мышиного рекомбинантного MASP-2 к образцам сыворотки MASP-2-/- восстанавливает опосредованную лектиновым путем активацию C4 в зависимости от концентрации белка, при измерении по депонированию C4b на маннане, как описано в Примере 2;

На ФИГУРЕ 7 представлены результаты, демонстрирующие, что классический путь функционален в MASP-2-/- линии, как описано в Примере 8;

На ФИГУРЕ 8A представлены результаты, демонстрирующие, что Fab2 антитело #11 против MASP-2 ингибирует образование C3 конвертазы, как описано в Примере 10;

На ФИГУРЕ 8B представлены результаты, демонстрирующие, что Fab2 антитело #11 против MASP-2 связывается с нативным крысиным MASP-2, как описано в Примере 10;

На ФИГУРЕ 8C представлены результаты, демонстрирующие, что Fab2 антитело #41 против MASP-2 ингибирует расщепление C4, как описано в Примере 10;

На ФИГУРЕ 9 представлены результаты, демонстрирующие, что все протестированные Fab2 антитела против MASP-2, которые ингибировали образование C3 конвертазы, как было установлено, также ингибировали расщепление C4, как описано в

Примере 10;

ФИГУРА 10 - диаграмма, иллюстрирующая рекомбинантные полипептиды, полученные на основе крысиного MASP-2, которые использовали для картирования эпитопов MASP-2-блокирующего Fab2 антитела, как описано в Примере 11;

На ФИГУРЕ 11 представлены результаты, демонстрирующие связывание Fab2 против MASP-2 #40 и #60 с полипептидами MASP-2 крысы, как описано в Примере 11;

На ФИГУРЕ 12A графически проиллюстрирован уровень депонирования МАК в присутствии или отсутствие моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646) в специфических для лектинового пути условиях анализа, демонстрируя, что OMS646 ингибирует опосредованное лектином депонирование МАК со значением IC_{50} приблизительно 1 нМ, как описано в Примере 12;

На ФИГУРЕ 12B графически проиллюстрирован уровень депонирования МАК в присутствии или отсутствие моноклонального антитела против человеческого MASP-2 (OMS646) в специфических для классического пути условиях анализа, демонстрируя, что OMS646 не ингибирует опосредованное классическим путем депонирование МАК, как описано в Примере 12;

На ФИГУРЕ 12C графически проиллюстрирован уровень депонирования МАК в присутствии или отсутствие моноклонального антитела против человеческого MASP-2 (OMS646) в специфических для альтернативного пути условиях анализа, демонстрируя, что OMS646 не ингибирует опосредованное альтернативным путем депонирование МАК, как описано в Примере 12;

На ФИГУРЕ 13 графически проиллюстрирован фармакокинетический (ФК) профиль моноклонального антитела против человеческого MASP-2 (OMS646) у мышей, показывающий концентрацию OMS646 (среднее для n=3 животных/групп) в зависимости от времени после введения в указанной дозе, как описано в Примере 12;

На ФИГУРЕ 14A графически проиллюстрирован фармакодинамический (ФД) ответ моноклонального антитела против человеческого MASP-2 (OMS646), измеренный как снижение системной активности лектинового пути, у мышей после внутривенного введения, как описано в Примере 12; на ФИГУРЕ 14B графически проиллюстрирован фармакодинамический (ФД) ответ моноклонального антитела против человеческого MASP-2 (OMS646), измеренный как снижение системной активности лектинового пути, у мышей после подкожного введения, как описано в Примере 12;

На ФИГУРЕ 15 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных Сириусом красным, где срезы ткани были получены у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, как описано в Примере 14;

На ФИГУРЕ 16 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, где срезы ткани были получены у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-

через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/-, как описано в Примере 14.

На ФИГУРЕ 17 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК коллагена-4, измеренные с помощью количественной ПЦР (кПЦР), в срезах ткани почек, полученных от мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, как описано в Примере 14.

На ФИГУРЕ 18 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК трансформирующего фактора роста бета-1 (TGFP-1), измеренные с помощью кПЦР, в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, как описано в Примере 14.

На ФИГУРЕ 19 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК интерлейкина-6 (IL-6), измеренные с помощью кПЦР, в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, как описано в Примере 14.

На ФИГУРЕ 20 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК интерферона-γ, измеренные с помощью кПЦР, в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ), а также ложнооперированных мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, как описано в Примере 14.

На ФИГУРЕ 21 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почки, окрашенных Сириусом красным, где срезы ткани были получены через 7 дней после односторонней обструкции мочеточника (ООМ) у мышей дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело и антитело изотипического контроля, как описано в Примере 15.

На ФИГУРЕ 22 графически проиллюстрировано содержание гидроксипролина в почках, собранных через 7 дней после односторонней обструкции мочеточников (ООМ) у мышей дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, по сравнению с уровнем гидроксипролина в ткани почек после обструкции, полученных у мышей дикого типа, получавших IgG4 изотипического контроля, как описано в Примере 15.

На ФИГУРЕ 23 графически проиллюстрировано общее количество белков сыворотки (мг/мл), измеренное в день 15 исследования белковой перегрузки у контрольных мышей дикого типа (n=2), которые получали только раствор хлорида натрия, у мышей дикого типа, которые получали BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, которые получали BSA (n=6), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 24 графически проиллюстрировано общее количество выводимого белка (мг) в моче, собранной в течение 24-часового периода в день 15 исследования белковой перегрузки у контрольных мышей дикого типа (n=2), которые получали только

физиологический раствор, мышей дикого типа, которые получали BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, которые получали BSA (n=6), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 25 показаны следующие репрезентативные окрашенные гематоксилином и эозином (ГЭ) срезы ткани почек следующих групп мышей в день 15 исследования белковой перегрузки: (панель A) контрольные мыши дикого типа; (панель B) контрольные MASP-2-/- мыши, (панель C) мыши дикого типа, получавшие BSA; и (панель D) мыши MASP-2-/-, получавшие бычий сывороточный альбумин (BSA), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 26 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, показывающих среднюю площадь окрашивания макрофагов (%), где срезы ткани были получены в день 15 исследования белковой перегрузки у контрольных мышей дикого типа (n=2), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=5), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 27A графически проиллюстрирован анализ на присутствие корреляции между макрофагами и протеинурией у каждой мыши дикого типа (n=6), получавшей BSA, путем построения кривой зависимости общего количества выделенных белков, измеренного в моче из 24-часового образца, от инфильтрации макрофагов (средний % от окрашенной площади), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 27B графически проиллюстрирован анализ на присутствие корреляции между макрофагами и протеинурией у каждой мыши MASP-2-/- (n=5), получавшей BSA, путем построения кривой зависимости общего количества выделенных белков в моче в 24-часовом образце, от инфильтрации макрофагов (средний % от окрашенной площади), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 28 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных антителом против TGFβ (при измерении в % от площади, окрашенной антителом к TGFβ), у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=5), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 29 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против ФНОα (при измерении в % от площади, окрашенной антителом к ФНОα), у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=5), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 30 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против IL-6 (при измерении в % от площади, окрашенной антителом к IL-6), у контрольных мышей дикого типа, контрольных мышей MASP-2-/-, мышей дикого типа, получавших BSA (n=7), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=7), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 31 графически проиллюстрирована частота апоптотических клеток при исследовании методом TUNEL, подсчитанных в последовательно отобранных 20 полях высокого увеличения (HPF), в срезах ткани коры почки мышей дикого типа (n=1),

мышей MASP-2-/- (n=1), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=7), как описано в Примере 16.

На ФИГУРЕ 32 показаны репрезентативные окрашенные ГЭ срезы тканей следующих групп мышей в день 15 после введения BSA: (панель A) контрольные мыши дикого типа, получавшие раствор хлорида натрия, (панель B) контрольные мыши, получавшие изотипическое антитело, и (панель C) мыши дикого типа, получавшие MASP-2-ингибирующее антитело, как описано в Примере 17.

На ФИГУРЕ 33 графически проиллюстрирована частота апоптотических клеток при исследовании методом TUNEL, подсчитанных в последовательно отобранных 20 полях высокого увеличения (HPF) срезов ткани коры почек мышей дикого типа, получавших контрольный раствор хлорида натрия и BSA (n=8), мышей дикого типа, получавших антитело изотипического контроля и BSA (n=8), и мышей дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело и BSA (n=7), как описано в Примере 17.

На ФИГУРЕ 34 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против TGFβ (при измерении в % от площади, окрашенной антителом против TGFβ), у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8), как описано в Примере 17.

На ФИГУРЕ 35 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против ФНОα (при измерении в % от площади, окрашенной антителом ФНОα), у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8), как описано в Примере 17.

На ФИГУРЕ 36 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных антителом против IL-6 (при измерении в % от площади, окрашенной антителом к IL-6), у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8), как описано в Примере 17.

На ФИГУРЕ 37 показаны репрезентативные, окрашенные ГЭ срезы тканей следующих групп мышей в день 14 после введения адриамицина или только раствора хлорида натрия (контроль): (панели A-1, A-2, A-3) контрольные мыши дикого типа, получавшие только раствор хлорида натрия; (панели B-1, B-2, B-3) мыши дикого типа, получавшие адриамицин; и (панели C-1, C-2, C-3) мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин, как описано в Примере 18;

На ФИГУРЕ 38 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, показывающие среднюю окрашенную площадь макрофагов (%) для

следующих групп мышей в день 14 после введения адриамицина или только раствора хлорида натрия (контроль дикого типа): контрольные мыши дикого типа, получавшие только раствор хлорида натрия; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; мыши MASP-2-/-, получавшие только раствор хлорида натрия, и мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин, где **p=0,007, как описано в Примере 18;

На ФИГУРЕ 39 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных Сириусом красным, показывающие окрашенную площадь (%) депонированного коллагена в следующих группах мышей в день 14 после введения адриамицина или только раствора хлорида натрия (контроль дикого типа): контрольные мыши дикого типа, получавшие только раствор хлорида натрия; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; мыши MASP-2-/-, получавшие только раствор хлорида натрия, и мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин, где **p=0,005, как описано в Примере 18; и

На ФИГУРЕ 40 графически проиллюстрировано альбумин/креатининовое соотношение в моче (АКС) у двух IgA пациентов в течение двенадцатинедельного исследования с еженедельным введением MASP-2-ингибирующего антитела (OMS646), как описано в Примере 19.

На ФИГУРЕ 41A показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани кровеносных сосудов перегородок из легкого пациента с COVID-19 (ГЭ, 400×), как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 41B показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани кровеносных сосудов перегородок из легкого пациента с COVID-19 (ГЭ, 400×), как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 41C показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани кровеносных сосудов среднего диаметра из перегородок легкого пациента с COVID-19, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 41D показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани паренхимы печени пациента с COVID-19 (ГЭ, 400×), как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 42A графически проиллюстрировано количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК)/мл в периферической крови здоровых людей из контрольной группы (n-6) по сравнению с количеством ЦЭК/мл у пациентов с COVID-19, которые не участвовали в этом исследовании (n=33), как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 42B графически проиллюстрировано количество ЦЭК/мл у 6 пациентов, отобранных для этого исследования, до (исходный уровень) и после лечения нарсоплимабом, прямоугольники обозначают значения от первого до третьего квартиля, горизонтальная линия показывает медианное значение, а усы указывают минимальное значение и максимальное значение, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 43 графически проиллюстрирован уровень С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке (медиана; межквартильный размах (МКР)) у 6 больных COVID-19 в

исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 44 графически проиллюстрирован уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке (медиана; МКР) у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 45 графически проиллюстрирован уровень интерлейкина 6 (IL-6) в сыворотке (медиана; межквартильный размах (МКР)) у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 46 графически проиллюстрирован уровень интерлейкина 8 (IL-8) в сыворотке (медиана; межквартильный размах (МКР)) у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 47А показан КТ-снимок пациента #4 в день 5 с момента включения в исследование (т.е. после лечения нарсоплимабом), где у пациента наблюдается тяжелая интерстициальная пневмония с диффузным затемнением по типу матового стекла, затрагивающим периферические и центральные области, уплотнение в нижних долях, особенно в левом легком, и массивная двусторонняя легочная эмболия с дефектами наполнения в междолевых и сегментарных артериях (не показаны), как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 47В показан КТ-снимок пациента #4 в день 16 с момента включения в исследование (т.е. после лечения нарсоплимабом), на котором затемнение по типу матового стекла значительно уменьшилось, и почти полностью исчезло паренхиматозное уплотнение, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 48 графически проиллюстрированы уровни IL-6 в сыворотке (пг/мл) в начале исследования и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом (после 2 доз, после четырех доз) у пациентов, получавших нарсоплимаб, где ящики указывают значения от первого до третьего квартиль, горизонтальная линия обозначает медианное значение, а точки указывают значения всех пациентов, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 49 графически проиллюстрированы уровни IL-8 в сыворотке (пг/мл) в начале исследования и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом (после двух доз, после 4 доз) у пациентов, получавших нарсоплимаб, где ящики указывают значения от первого до третьего квартиля, горизонтальная линия обозначает медианное значение, а точки указывают значения всех пациентов, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 50 графически проиллюстрирован клинический результат лечения нарсоплимабом шести пациентов, инфицированных COVID-19, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 51А графически проиллюстрированы значения уровней

аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке (единиц/литр, Ед/л) до и после лечения нарсоплимабом. Черные линии обозначают медиану и межквартильный размах (МКР). Красная линия обозначает уровень нормальных значений, и точки указывают значения всех пациентов, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 51B графически проиллюстрированы значения уровней D-димера в сыворотке (нг/мл) у четырех пациентов, исходные показатели которых были доступны до начала лечения нарсоплимабом. Черные кружки указывают, когда было начата терапия стероидами. Красная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 21.

На ФИГУРЕ 52A графически проиллюстрированы значения уровня D-димера в сыворотке (нг/мл) у седьмого пациента, инфицированного COVID-19, получавшего нарсоплимаб (пациент #7), в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, где введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками, и где горизонтальная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 52B графически проиллюстрирован уровень С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке у пациента #7, инфицированного COVID-19, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, где введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками, и где горизонтальная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 52C графически проиллюстрирован уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке (единиц/литр, Ед/л) у пациента #7, инфицированного COVID-19, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, где введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками, и где горизонтальная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 52D графически проиллюстрированы уровень аланинтрансаминазы (АЛТ) в сыворотке крови у пациента #7, инфицированного COVID-19, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, где введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками, и где горизонтальная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 52E графически проиллюстрирован уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке у пациента #7 с COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные моменты времени после лечения нарсоплимабом, где введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками, и где горизонтальная линия обозначает уровень нормальных значений, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 53 графически проиллюстрирован титр антител против SARS-CoV-2 у пациента #7 в динамике, указывающий, что лечение нарсоплимабом не нарушает эффекторную функцию адаптивного иммунного ответа, как описано в Примере 22.

На ФИГУРЕ 54 графически проиллюстрировано зависимое от концентрации связывание рекомбинантного MASP-2 с нуклеокапсидным белком SARS-Cov-2 (NP2) в сравнении с контролем BSA, как описано в Примере 23.

На ФИГУРЕ 55 представлен ДСН-ПААГ гель Вестерн-блоттинга, показывающий, что MASP-2 непосредственно связывается с NP и расщепляет C4, при этом добавление MASP-2-ингибирующего антитела HG4 ингибирует NP/MASP-2-опосредованное расщепление C4, как описано в Примере 23.

На ФИГУРЕ 56 графически проиллюстрированы значения CH50 в различных группах субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике обозначает отдельного субъекта, как описано в Примере 24.

На ФИГУРЕ 57 графически проиллюстрированы уровни C5a (нг/мл) в образцах плазмы, полученных в различных группах субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике обозначает отдельного субъекта, как описано в Примере 24.

На ФИГУРЕ 58 графически проиллюстрирован уровень Bb (мкг/мл) в плазме, полученной в различных группах субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике обозначает отдельного субъекта, как описано в Примере 24.

На ФИГУРЕ 59 графически проиллюстрировано количество комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженное на основе значений OD_{450}, с каждым из четырех кандидатных мАт против MASP-2 (клоны C1, C7, D8 и H1) при различных концентрациях активированной сыворотки, как описано в Примере 25.

На ФИГУРЕ 60 графически проиллюстрированы результаты анализа ИФА, измеряющего комплекс MASP-2/C1-INH в 5% сыворотке пациентов с острым COVID (16 образцов от 3 пациентов <14 дней после госпитализации), выздоравливающих пациентов (n=15), серопозитивных сотрудников (n=15) и серонегативных сотрудников (n=34), как описано в Примере 25.

На ФИГУРЕ 61 графически проиллюстрировано количество комплекса MASP-2/C1-INH, присутствующего у 3 пациентов с острым COVID-19 (#2, #3 и #4) при поступлении в стационар и в течение до 14 дней после поступления, где линия внизу графика указывает количество MASP-2/C1-INH, обнаруженное в пулах здоровых серонегативных медработников, как описано в Примере 25.

ФИГУРА 62 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую этапы иммунофлуоресцентного анализа на основе гранул, в котором используются антитела против C1s или антитела против MASP-2, иммобилизованные на полистирольных микросферах или магнитных полистирольных микросферах (т.е. гранулах), для захвата комплексов сериновой протеазы/C1-INH (т.е. аналита) из сыворотки или плазмы крови человека, и антитела против C1INH в качестве детектирующего антитела для обнаружения захваченных комплексов, как описано в Примере 26.

На ФИГУРЕ 63 графически проиллюстрировано обнаружение комплексов MASP-

2/C1-INH в смешанной человеческой сыворотке пациентов с острым COVID-19 в анализе на основе гранул с использованием мАт против MASP-2 #C8 в качестве захватывающего антитела в сравнении с контрольными гранулами, покрытыми BSA, как описано в Примере 26.

ФИГУРА 64 представляет собой фотографию невосстанавливающего геля, на который нанесли 6 мкг образцов, полученных в ходе SEC очистки комплексов рекомбинантного MASP-2/C1-INH, как описано в Примере 27.

На ФИГУРЕ 65 графически проиллюстрированы уровни комплекса MASP-2/C1-INH у пациентов с острым COVID-19, определенные в дуплексном анализе на основе гранул, как описано в Примере 28.

На ФИГУРЕ 66 графически проиллюстрированы уровни комплекса C1s/C1-INH у пациентов с острым COVID-19, определенные в дуплексном анализе на основе гранул, как описано в Примере 28.

На ФИГУРЕ 67 графически проиллюстрированы значения CH_{50} у пациентов с острым COVID-19, выздоравливающих пациентов, серопозитивных и серонегативных сотрудников в продольном исследовании, как описано в Примере 28.

На ФИГУРЕ 68 графически проиллюстрированы значения C5a у пациентов с острым COVID-19, выздоравливающих пациентов, серопозитивных и серонегативных сотрудников в продольном исследовании, как описано в Примере 28.

На ФИГУРЕ 69 графически проиллюстрированы уровни комплекса MASP-2/C1-INH в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 на момент поступления (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (на 3-4 день после начала лечения; 7-8 день, 9 день до выписки) по сравнению с 16 здоровыми людьми из контрольной группы, как описано в Примере 29.

На ФИГУРЕ 70A графически проиллюстрированы значения CH_{50} в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 на момент поступления (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (на 3-4 день после начала лечения; 7-8 день, 9 день до выписки) по сравнению с 16 здоровыми людьми из контрольной группы, как описано в Примере 29.

На ФИГУРЕ 70B графически проиллюстрированы значения C5a в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 на момент поступления (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (на 3-4 день после начала лечения; 7-8 день, 9 день до выписки) по сравнению с 16 здоровыми людьми из контрольной группы, как описано в Примере 29.

На ФИГУРЕ 71 графически проиллюстрированы уровни комплекса MASP-2/C1-INH в образцах 7 больных COVID-19 на момент поступления (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (2-4 день после начала лечения; 6-8 день и 9 день до выписки) по сравнению с образцами, полученными у 9 больных COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не подвергавшиеся лечению пациенты из контрольной группы) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов

(здоровых субъектов из контрольной группы), как описано в Примере 30.

На ФИГУРЕ 72A графически проиллюстрированы значения CH_{50} в образцах 7 больных COVID-19 на момент поступления (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (2-4 день после начала лечения; 6-8 день и 9 день до выписки) по сравнению с образцами, полученными у 9 больных COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не подвергавшиеся лечению пациенты из контрольной группы) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов (здоровых субъектов из контрольной группы), как описано в Примере 30.

На ФИГУРЕ 72B графически проиллюстрированы значения C5a в образцах 7 больных COVID-19 на момент поступления (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (2-4 день после начала лечения; 6-8 день и 9 день до выписки) по сравнению к образцам, полученными у 9 больных COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не подвергавшиеся лечению пациенты из контрольной группы) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов (здоровых субъектов из контрольной группы), как описано в Примере 30.

На ФИГУРЕ 73 графически проиллюстрировано количество жизнеспособных бактерий K. pneumoniae после инкубирования сыворотки больных COVID-19 до лечения нарсоплимабом (до лечения) и у больных COVID-19 после лечения нарсоплимабом по сравнению с сывороткой больных COVID-19, не получавших нарсоплимаб, по сравнению с нормальной сывороткой здоровых субъектов (NHS) и термоинактивированной нормальной сывороткой здоровых субъектов (HI-NHS), как описано в Примере 30.

ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 кДНК MAp19 человека

SEQ ID NO:2 белок MAp19 человека (с лидерной последовательностью)

SEQ ID NO:3 белок MAp19 человека (зрелый)

SEQ ID NO:4 кДНК MASP-2 человека

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

SEQ ID NO:6 белок MASP-2 (зрелый)

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

АНТИГЕНЫ: (В ОТНОШЕНИИ ЗРЕЛОГО БЕЛКА MASP-2)

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

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

SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII (ак 1-293)

SEQ ID NO:11 область EGF (ак 122-166)

SEQ ID NO:12 домен сериновой протеазы (ак 429-671)

SEQ ID NO:13 неактивный домен сериновой протеазы (ак 610-625 с мутацией Ser618→Ala)

SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUBI)

SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI)

SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (центральная часть МСЛ-связывающей области)

SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (МСЛ-связывающая область)

SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (пептид EGF)

SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (центральная связывающая последовательность сериновой протеазы) Подробное описание

ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ:

SEQ ID NO:20 полноразмерная кДНК МСЛ

SEQ ID NO:21 полноразмерный белок МСЛ

SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (консенсусная связывающая последовательность)

SEQ ID NO:23 OGKLG

SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G

SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO

SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG

SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-фиколин человека)

SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (фиколин p35 человека)

SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (сайт расщепления C4)

ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ:

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

SEQ ID NO:31

5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3'

Нуклеотиды 12-45 из SEQ ID NO:4, включая участок инициации трансляции MASP-2 (смысловой) SEQ ID NO:32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'

Нуклеотиды 361-396 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, включающую МСЛ-связывающий участок MASP-2 (смысловой) SEQ ID NO:33

5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'

Нуклеотиды 610-642 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, включающую домена CUBII

ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ:

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

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

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

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

SEQ ID NO:38-47 праймеры для клонирования гуманизированного антитела

SEQ ID NO:48 представляет собой 9 ак пептидную связь

ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ:

SEQ ID NO:49 представляет собой вставкой минигена MASP-2

SEQ ID NO: 50 кДНК MASP-2 мыши

SEQ ID NO: 51 белок MASP-2 мыши (с лидерной последовательностью)

SEQ ID NO: 52 зрелый белок MASP-2 мыши

SEQ ID NO: 53 кДНК MASP-2 крысы

SEQ ID NO: 54 белок MASP-2 крысы (с лидерной последовательностью)

SEQ ID NO: 55 зрелый белок MASP-2 крысы

SEQ ID NO: 56-59 олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 человека, используемые для получения MASP-2A человека

SEQ ID NO: 60-63 олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 мыши, используемые для получения MASP-2A мыши

SEQ ID NO: 64-65 олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 крысы, используемые для получения MASP-2A крысы

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

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

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

SEQ ID NO: 69 полипептид вариабельной области легкой цепи (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 70 ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

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

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

SEQ ID NO: 73: SGMI-2M (средняя усеченная версия)

SEQ ID NO:74: SGMI-2S (короткая усеченная версия)

SEQ ID NO:75: зрелый полипептид, включающий VH-M2ab6-SGMI-2-N и константную область IgG4 человека с мутацией в шарнирной области

SEQ ID NO:76: зрелый полипептид, включающий VH-M2ab6-SGMI-2-C и константную область IgG4 человека с мутацией в шарнирной области

SEQ ID NO:77: зрелый полипептид, включающий VL-M2ab6-SGMI-2-N и константную область лямбда Ig человека

SEQ ID NO:78: зрелый полипептид, включающий VL-M2ab6-SGMI-2-C и константную область лямбда Ig человека

SEQ ID NO:79: пептидный линкер (10 ак)

SEQ ID NO:80: пептидный линкер (6 ак)

SEQ ID NO:81: пептидный линкер (4 ак)

SEQ ID NO:82: полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий VH-M2ab6-SGMI-2-N и константную область IgG4 человека с мутацией в шарнирной области

SEQ ID NO:83: полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий VH-M2ab 6-SGMI-2-C и константную область IgG4 человека с мутацией в шарнирной области

SEQ ID NO:84: полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий VL-M2ab6-SGMI-2-N и константную область лямбда Ig человека

SEQ ID NO:85: полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий VL-M2ab6-SGMI-2-C и константную область лямбда Ig человека

SEQ ID NO:86: ингибитор C1 (C1-INH) homo sapiens

SEQ ID NO:87: вариабельная область тяжелой цепи мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:88: вариабельная область легкой цепи мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:89: HC-CDR1 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:90: HC-CDR2 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:91: HC-CDR3 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:92: LC-CDR1 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:93: LC-CDR2 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:94: LC-CDR3 мАт к MASP-2 C7

SEQ ID NO:95: кДНК мАт к MASP-2 C7, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи

SEQ ID NO:96: кДНК мАт к MASP-2 C7, кодирующая вариабельную область легкой цепи

SEQ ID NO:97: вариабельная область тяжелой цепи мАт к MASP-2 C8

SEQ ID NO:98: вариабельная область легкой цепи мАт к MASP-2 C8

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Как описано в настоящем документе, авторы изобретения отметили, что концентрации MASP-2/C1-INH в крови (например, в сыворотке и/или плазме) аномально повышены у пациентов с тяжелой формой COVID-19, а также у субъектов, ранее инфицированных COVID-19 и страдающих от долгосрочных последствий. Авторы изобретения также отметили, что после выздоровления концентрация комплекса MASP-2/C1-INH в большинстве случаев снижается до нормального уровня. Авторы изобретения предполагают, что наблюдение за пациентом, инфицированным SARS-CoV-2, на предмет повышения концентрации комплекса MASP-2/C1-INH полезно для диагностики у пациента присутствия или риска развития острого COVID-19, а также для диагностики у субъекта присутствия или риска развития постострого COVID-19 (также называемого долгий COVID-19) и, необязательно, лечения субъекта, у которого выявлен такой риск, с применением ингибитора комплемента, такого как ингибитор MASP-2. Как далее описано в настоящем документе, применение MASP-2-ингибирующего средства также полезно для лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома у субъекта, инфицированного коронавирусом, таким как COVID-19, а также полезно для лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого нарушения дыхания у субъекта, инфицированного вирусом гриппа. Таким образом, мониторинг статуса комплекса MASP-2/C1-INH также может быть полезен для определения, отвечает ли пациент с COVID-19 на терапию ингибитором комплемента, таким как ингибитор MASP-2, и, необязательно, для корректировки дозы MASP-2, если это необходимо для

приведения уровня MASP-2/C1-INH в диапазон нормальных значений.

В изобретении также предложены способы анализа для измерения комплекса MASP-2/C1-INH в жидкой фазе в биологическом образце. Также предложены композиции, наборы и способы определения концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в жидкой фазе в биологической жидкости, такой как биологическая жидкость, полученная у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если в настоящем документе конкретно не определено иное, все термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое понятно средним специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Следующие определения представлены для обеспечения ясности в отношении терминов при их использовании в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения.

При использовании в настоящем документе термин "MASP-2-зависимая активация комплемента" включает MASP-2-зависимую активацию лектинового пути, которая возникает при физиологических состояниях (т.е. в присутствии Ca^{++}), приводя к образованию C3-конвертазы C4b2a лектинового пути, и при накоплении продукта расщепления C3, C3b, затем до C5-конвертазы C4b2a(C3b)n, которая, как было определено, в первую очередь вызывает опсонизацию.

При использовании в настоящем документе термин "альтернативный путь" относится к активации комплемента, которую инициирует, например, зимозан из клеточных стенок грибков и дрожжей, липополисахарид (ЛПС) из наружных мемран грамотрицательных микроорганизмов и эритроцитов кролика, а также из различных очищенных полисахаридов, эритроцитов кролика, вирусов, бактерий, опухолевых клеток животных, паразитов и поврежденных клеток, и которая, как традиционно считали, возникает из-за спонтанного протеолитического образования C3b из фактора комплемента C3.

При использовании в настоящем документе термин "лектиновый путь" относится к активации комплемента, которая происходит в результате специфического связывания сывороточных и несывороточных углевод-связывающих белков, в том числе маннансвязывающего лектина (МСЛ), CL-11 и фиколинов (H-фиколина, M-фиколина или L-фиколина).

При использовании в настоящем документе, термин "классический путь" относится к активации комплемента, которая инициируется антителом при связывании с чужеродной частицей и требует связывания распознающей молекулы C1q.

При использовании в настоящем документе термин "MASP-2-ингибирующее средство" относится к любому средству, которое связывается или непосредственно взаимодействует с MASP-2 и эффективно ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента, в том числе к антителам против MASP-2 и их MASP-2-связывающим фрагментам, природным и синтетическим пептидам, малым молекулам, растворимым

рецепторам MASP-2, ингибиторам экспрессии и выделенным природным ингибиторам, а также включает пептиды, которые конкурируют с MASP-2 за связывание с другой распознающей молекулой (например, МСЛ, H-фиколином, M-фиколином или L-фиколином) в лектиновом пути, но не охватывает антитела, которые связываются с другими распознающими молекулами. MASP-2-ингибирующие средства, применимые в способе согласно изобретению, могут снижать MASP-2-зависимую активацию комплемента больше чем на 20%, например, больше чем на 50%, например, больше чем на 90%. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство снижает MASP-2-зависимую активацию комплемента больше чем на 90% (т.е. приводит только к MASP-2 активации комплемента 10% или меньше).

При использовании в настоящем документе термин "фиброз" относится к образованию или присутствию избыточной соединительной ткани в органе или ткани. Фиброз может возникать как напавравленный на восстановление или замену ответ на раздражитель, такой как повреждение ткани или воспаление. Характерным признаком фиброза является образование избыточного внеклеточного матрикса. Нормальная физиологическая реакция на травму приводит к отложению соединительной ткани как части процесса заживления, однако такое отложение соединительной ткани может сохраняться и становиться патологическим, вызывая изменение структуры и функции ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты, что приводит к сокращению матрикса, повышению ригидности, компрессии микрососудов и гипоксии.

При использовании в настоящем документе термин "лечение фиброза у субъекта-млекопитающего, страдающего или подвергающегося риску развития заболевания или нарушения, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением", относится к регрессии, облегчению, уменьшению или подавлению фиброза у указанного субъекта-млекопитающего.

При использовании в настоящем документе термин "протеинурия" относится к присутствию белка в моче в отклоняющемся от нормы количестве, например, в количествах, превышающих 0,3 г белка в суточной моче, собранной у субъекта-человека, или в концентрациях выше 1 г на литр у субъекта-человека.

При использовании в настоящем документе термин "улучшение протеинурии" или "уменьшение протеинурии" относится к снижению суточного выведения белка с мочой у субъекта, страдающего протеинурией, по меньшей мере на 20%, например, по меньшей мере на 30%, например, по меньшей мере на 40%, например, по меньшей мере на 50% или больше по сравнению с исходным суточным выведением белка с мочой у субъекта до лечения MASP-2-ингибирующим средством. В одном варианте осуществления лечение MASP-2-ингибирующим средством в соответствии со способами согласно изобретению эффективно уменьшает протеинурию у субъекта-человека, например, с достижением больше чем 20-процентного снижения суточного выведения белка с мочой или, например, больше чем 30-процентного снижения суточного выведения белка с мочой или, например,

больше чем 40-процентного снижения суточного выведения белка с мочой или, например, больше чем 50-процентного снижения суточного выведения белка с мочой.

При использовании в настоящем документе термины "малая молекула", "малая органическая молекула" и "малая неорганическая молекула" относятся к молекулам (органическим, металлоорганическим или неорганическим), органическим молекулам и неорганическим молекулам, соответственно, которые являются природными или синтетическими, и которые имеют молекулярную массу больше чем приблизительно 50 Да и меньше чем приблизительно 2500 Да. Малые органические (например) молекулы могут иметь массу меньше чем приблизительно 2000 Да, от приблизительно 100 до приблизительно 1000 Да или от приблизительно 100 до приблизительно 600 Да, или приблизительно от 200 до 500 Да.

При использовании в настоящем документе термин "антитело" охватывает антитела и их фрагменты, полученные из любого антитело-продуцирующего млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека), или из гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии или трансгенных животных (или других способов получения антител или фрагментов антител), которые специфично связываются с полипептидом-мишенью, таким как, например, MASP-2, полипептидами или их частями. Предполагается, что термин "антитело" не ограничен в отношении источника антитела или способа, которым оно получено (например, при использовании гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного, пептидного синтеза и т.д.). Примеры антител включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; панспецифичные, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, триспецифичные антитела); гуманизированные антитела; мышиные антитела; химерные антитела, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека; а также антиидиотипические антитела, и могут быть любым интактным антителом или его фрагментом. При использовании в настоящем документе термин "антитело" включает не только интактные поликлональные и моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), одноцепочечные (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, слитые белки, включающие иммуноглобулиновую часть с антигенсвязывающим фрагментом требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела, а также любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает антигенсвязывающий участок или фрагмент (эпитоп-распознающий участок) требуемой специфичности.

"Моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, где моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), которые участвуют в селективном связывании эпитопа. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью в отношении антигена-мишени. Термин "моноклональное антитело" включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но и их фрагменты (например, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv),

одноцепочечные (ScFv), их варианты, слитые белки, включающие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает антигенсвязывающий фрагмент (эпитоп-распознающий участок) требуемой специфичности и способность связываться с эпитопом. Подразумевается, что антитело не ограничено в отношении своего источника или способа, с использованием которого оно получено (например, при использовании гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного и т.д.). Данный термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением "антитело".

При использовании в настоящем документе термин "фрагмент антитела" относится к части, полученной из или относящейся к полноразмерному антителу, такому как, например, антитело против MASP-2, как правило, включающее 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, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, полученные из фрагментов антител.

При использовании в настоящем документе "одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела включает V_H и V_L домены антитела, где такие домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно включает полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который позволяет scFv образовывать нужную структуру для связывания антигена.

При использовании в настоящем документе "химерное антитело" представляет собой рекомбинантный белок, который содержит вариабельные домены и определяющие комплементарность области, полученные из антитела не относящихся к человеку биологических видов (например, грызуна), тогда как остальная часть молекулы антитела получена из человеческого антитела.

При использовании в настоящем документе "гуманизированное антитело" представляет собой химерное антитело, которое включает минимальную последовательность, которая соответствует специфическим определяющим комплементарность областям, полученным из нечеловеческого иммуноглобулина, которые были перевиты в каркас человеческого антитела. Гуманизированные антитела обычно представляют собой рекомбинантные белки, в которых только определяющие комплементарность области антитела не имеют человеческое происхождение.

При использовании в настоящем документе термин "маннансвязывающий лектин" ("МСЛ") эквивалентен маннансвязывающему белку ("МСБ").

При использовании в настоящем документе "мембраноатакующий комплекс" ("МАК") относится к комплексу пяти терминальных компонентов комплемента (C5b в комбинации с C6, C7, C8 и C-9), который встраивается в мембраны и разрушает их (также называется C5b-9).

При использовании в настоящем документе "субъект" включает всех млекопитающих, в том числе, без ограничения, человека, не относящихся к человеку приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

При использовании в настоящем документе аминокислотные остатки сокращенно обозначены 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; E), пролин (Pro; P), Серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

В самом широком смысле природные аминокислоты можно подразделить на группы по химическим свойствам боковой цепи соответствующих аминокислот. Под "гидрофобной" аминокислотой подразумевается Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. Под "гидрофильной" аминокислотой подразумевается Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эта группа аминокислот может быть дополнительно подразделена на следующие подклассы. Под "незаряженной гидрофильной" аминокислотой подразумевается Ser, Thr, Asn или Gln. Под "кислотной" аминокислотой подразумевается Glu или Asp. Под "основной" аминокислотой подразумевается Lys, Arg или His.

При использовании в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" проиллюстрирован заменой между аминокислотами в 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.

Термин "олигонуклеотид" при использовании в настоящем документе относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), или их миметикам. Данный термин также охватывает такие олигонуклеиновые основания, которые состоят из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (скелетных) связей, а также олигонуклеотидов с неприродными модификациями.

При использовании в настоящем документе "эпитоп" относится к участку на белке (например, белке MASP-2 человека), который связывается антителом. "Перекрывающиеся эпитопы" включают по меньшей мере один (например, два, три, четыре, пять или шесть) общих аминокислотных остатков, в том числе линейные и нелинейные эпитопы.

При использовании в настоящем документе термин "полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и означают любую цепь аминокислот, связанных пептидными связями, независимо от ее длины или посттрансляционной модификации. Белок MASP-2, описанный в настоящем документе, может содержать или представлять собой белки дикого типа или может быть вариантами, которые содержат не больше 50 (например, не больше одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50) консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены, как правило, включают замены в пределах следующих групп:

глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

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

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

Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей определяют как процент аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотам в референсной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, при необходимости, для получения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание в целей определения процента идентичности последовательностей может быть выполнено различными способами, известными специалистам в данной области, например, при использовании общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены с помощью известных методов.

II. Обзор изобретения

Как описано в настоящем документе, авторы изобретения установили центральную роль лектинового пути в инициировании и прогрессировании заболеваний канальцевой почечной патологии, что предполагает ключевую роль активации лектинового пути в патофизиологии широкого спектра заболеваний почек, включая IgA-нефропатию, C3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты. Как дополнительно описано в настоящем документе, авторы изобретения обнаружили, что ингибирование маннан-связывающй

лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2), ключевого регулятора лектинового пути системы комплемента, значительно уменьшает воспаление и фиброз в различных моделях фиброзного заболевания на животных, включая модель односторонней обструкции мочеточника (OOM), модели перегрузки белком и адриамицин-индуцированной нефрологической модели фиброза почек. Таким образом, авторы изобретения продемонстрировали, что ингибирование MASP-2-опосредованной активации лектинового пути обеспечивает эффективный терапевтический подход к облегчению, лечению или профилактике фиброза почек, например тубулоинтерстициального фиброза, независимо от первопричины. Как дополнительно описано в настоящем документе, применение ингибитора MASP-2 также полезно для лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома у субъекта, инфицированного коронавирусом, таким как COVID-19.

Лектины (МСЛ, М-фиколин, Н-фиколин, L-фиколин и CL-11) представляют собой специфические распознающие молекулы, которые инициируют природную систему комплемента, и система включает в себя инициацию лектинового пути и связанную петлю усиления терминального пути, которая усиливает инициированную лектином активизацию эффекторных молекул терминального комплемента. C1q представляют собой специфическую распознающую молекулу, которая инициирует нужную систему комплемента, и система включает в себя инициацию классического пути и связанную петлю усиления терминального пути, которая усиливает C1q-инициированную активацию эффекторных молекул терминального комплемента. Эти две основных системы активации комплемента соответственно называются лектин-зависимой системой комплемента и C1q-зависимой системой комплемента.

В дополнение к своей важной роли в иммунной защите, система комплемента участвует в повреждении тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует острая необходимость в разработке терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения таких нежелательных эффектов. С установлением того, что можно блокировать лектин-опосредованный путь MASP-2 при сохранении классического пути незатронутым, приходит понимание того, что было бы крайне желательно специфически ингибировать только ту систему активации комплемента, которая вызывает конкретную патологию, без полного выключения функций иммунной защиты комплемента. Например, при патологиях, при которых активация комплемента опосредована преимущественно лектинзависимой системой комплемента, было бы выгодно специфически ингибировать только эту систему. Это позволило бы сохранить интактной C1q-зависимую систему активации комплемента для работы процессинга иммунного комплекса и помощи в защите организма-хозяина от инфекции.

Предпочтительным белковым компонентом в качестве мишени при разработке терапевтических средств для специфического ингибирования лектинзависимой системы комплемента является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов

лектинзависимой системы комплемента (МСЛ, H-фиколина, M-фиколина, L-фиколина, MASP-2, C2-C9, Фактора B, Фактора D и пропердина) только MASP-2 является не только уникальным для лектинзависимой системы комплемента, но и необходимым для функционирования системы. Лектины (МСЛ, H-фиколин, M-фиколин, L-фиколин и CL-11) также представляют собой уникальные компоненты в лектинзависимой системе комплемента. Тем не менее, потеря какого-либо из лектиновых компонентов не вызывает обязательно ингибирование активации системы из-за избытка лектина. Чтобы гарантированно ингибировать лектинзависимую систему активации комплемента нужно ингибировать все пять лектинов. Кроме того, поскольку также известно, что МСЛ и фиколины обладают опсонической активностью, независимой от комплемента, ингибирование функции лектина могло бы привести к потере этого полезного механизма защиты организма-хозяина от инфекции. В отличие от этого, такая комплемент-независимая опсоническая активность лектина оставалась бы интактной, если бы MASP-2 был мишенью для ингибирования. Дополнительным преимуществом MASP-2 в качестве терапевтической мишени при ингибировании лектинзависимой системы активации комплемента является то, что концентрация MASP-2 в плазме крови является одной из самых низких для каких-либо белков комплемента (≈500 нг/мл); таким образом, соответственно, низкие концентрации высокоаффинных ингибиторов MASP-2 могут быть достаточными для получения полного ингибирования (Moller-Kristensen, M., et al., J. Immunol Methods 282:159-167, 2003).

Как описано в настоящем документе в Примере 14, в модели фиброзного заболевания почек на животных (односторонняя обструкция мочеточника, OOM) было определено, что у мышей без гена MASP-2 (MASP-2-/-) наблюдается значительно менее выраженное заболевание почек по сравнению с контрольными животными дикого типа, что подтверждают воспалительные клеточные инфильтраты (снижение на 75%) и гистологические маркеры фиброза, такие как отложение коллагена (снижение на треть). Как дополнительно показано в Примере 15, мыши дикого типа, получавшие системно моноклональное антитело против MASP-2, которое селективно блокирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь, были защищены от фиброза почек по сравнению с мышами дикого типа, которые получали антитело изотипического контроля. Эти результаты демонстрируют, что лектиновый путь вносит ключевой вклад в заболевание почек, а также дополнительно демонстрируют, что ингибитор MASP-2, который блокирует лектиновый путь, такой как антитело к MASP-2, эффективен в качестве противофиброзного средства. Как дополнительно показано в Примере 16, в модели белковой перегрузки у мышей дикого типа, получавших бычий сывороточный альбумин (BSA), развивалась протеинурическая нефропатия, тогда как у мышей MASP-2-/-, получавших такой же уровень BSA, повреждение почек было снижено. Как показано в Примере 17, мыши дикого типа, которым системно вводили моноклональное антитело против MASP-2, которое селективно блокирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь, были защищены от повреждения почек в модели белковой перегрузки.

Как описано в Примере 18, у мышей MASP-2-/- наблюдалось менее выраженное воспаление почек и тубулоинтерстициальное повреждение в адриамицин-индуцированной нефрологической модели фиброза почек по сравнению с мышами дикого типа. Как описано в Примере 19, в продолжающемся открытом исследовании фазы 2 тарапии заболевания почек пациенты с IgA-нефропатией, которые получали антитело против MASP-2, демонстрировали клинически значимое и статистически значимое снижение альбумин-креатининового соотношения в моче (АКС) на протяжении всего исследования и снижение суточных уровней белка в моче от исходного состояния до конца лечения. Как дополнительно описано в Примере 19, в том же исследовании фазы 2 тарапии заболевания почек у пациентов с мембранозной нефропатией, которые получали антитело против MASP-2, также наблюдали снижение АКС во время лечения.

В соответствии с вышеизложенным, настоящее изобретение относится к применению ингибиторов MASP-2, таких как MASP-2-ингибирующие антитела, в качестве противофиброзных средств, к применению ингибиторов MASP-2 для производства лекарственного средства для лечения фиброзного состояния, а также к способам предотвращения, лечения, облегчения или регрессии фиброзного состояния у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение указанному пациенту эффективного количества ингибитора MASP-2 (например, антитела против MASP-2).

Как описано в Примерах 20, 21 и 22, клиническое улучшение наблюдали у пациентов, страдающих связанной с COVID-19 дыхательной недостаточностью, после лечения нарсоплимабом, который ингибирует MASP-2 и активацию лектинового пути. Как описано в Примере 21, все шесть больных COVID-19, получавших нарсоплимаб, продемонстрировали клиническое улучшение. В каждом случае повреждение легких, вызванное COVID-19, прогрессировало до ОРДС до начала лечения нарсоплимабом, при этом все пациенты получали неинвазивную искусственную вентиляцию легких на момент начала лечения. Больные COVID-19, получавшие нарсоплимаб, для которых были доступны данные последующего наблюдения (5-6 месяцев), не демонстрировали наблюдаемые клинические или лабораторные признаки долгосрочных последствий. Как дополнительно описано в Примере 22, дополнительные больные COVID-19, получавшие нарсоплимаб, также продемонстрировали клиническое улучшение. Как дополнительно показано в Примере 22, у пациентов, получавших нарсоплимаб, развивались достаточно высокие титры антител против SARS-Cov-2, что указывает на то, что лечение нарсоплимабом не нарушает эффекторную функцию адаптивного иммунного ответа.

Как дополнительно описано в Примерах 24-30, авторы изобретения обнаружили, что концентрации MASP-2/C1-INH в крови (например, в сыворотке и/или плазме крови) аномально повышены у пациентов с тяжелой формой COVID-19, а также у субъектов, ранее инфицированных COVID-19 и страдающих от долгосрочных последствий. Авторы изобретения также наблюдали, что после выздоровления концентрация комплекса MASP-2/C1-INH в большинстве случаев снижается до нормального уровня. Авторы изобретения

считают, что наблюдение за пациентом, инфицированным SARS-CoV-2, на предмет повышения концентрации комплекса MASP-2/C1-INH полезно для диагностики у пациента присутствия или риска развития острого COVID-19, а также для диагностики у субъекта присутствия или риска развития пост-острого COVID-19 (также называемого синдромом долгого COVID-19) и, необязательно, лечения субъекта, у которого выявлен такой риск, с применением ингибитора комплемента, такого как ингибитор MASP-2. Как дополнительно описано в настоящем документе, применение ингибитора MASP-2 также полезно для лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома у субъекта, инфицированного коронавирусом, таким как COVID-19, а также полезно для лечения, подавления, облегчения или предотвращения острой дыхательной недостаточности у субъекта, инфицированного вирусом гриппа. Таким образом, мониторинг статуса комплекса MASP-2/C1-INH также может быть полезен для определения, отвечает ли пациент с COVID-19 на терапию ингибитором комплемента, таким как ингибитор MASP-2, и, необязательно, для корректировки дозы MASP-2, если это необходимо для приведения уровня MASP-2/C1-INH в диапазон нормальных значений.

В изобретении также предложены способы анализа для измерения комплекса MASP-2/C1-INH в жидкой фазе в биологическом образце. Также предложены композиции, наборы и способы определения концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в жидкой фазе в биологической жидкости, такой как биологическая жидкость, полученная у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2.

Таким образом, способы согласно изобретению могут применяться для лечения, подавления, облегчения, предотвращения или регрессии вызванной коронавирусом пневмонии или острого респираторного дистресс-синдрома у субъекта-человека, страдающего коронавирусной инфекцией, такой как COVID-19, SARS или MERS, как дополнительно описано в настоящем документе. Способы согласно изобретению также могут применяться для лечения, подавления, облегчения, предотвращения или регрессии вызванной вирусом гриппа пневмонии или острого респираторного дистресс-синдрома у субъекта-человека, страдающего инфекцией, вызванной вирусом гриппа, таким как серотипы вируса гриппа типа A (H1N1 (вызвавший пандемии "испанского гриппа" в 1918 году и "свиного гриппа" в 2009 году), H2N2 (вызвавший пандемию "азиатского гриппа" в 1957 году), H3N2 (вызвавший пандемию "гонконгского гриппа" в 1968 году), H5N1 (вызвавший пандемию "птичьего гриппа" в 2004 году), H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9 и H6N1) или вирус гриппа типа B, или вирус гриппа типа C.

III. РОЛЬ MASP-2 ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И СОСТОЯНИЯХ, ВЫЗВАННЫХ ИЛИ ОСЛОЖНЕННЫХ ФИБРОЗОМ

Фиброз - это образование или присутствие избыточной соединительной ткани в органе или ткани, обычно в ответ на повреждение или травму. Характерным признаком фиброза является образование избыточного внеклеточного матрикса после травмы. В почках фиброз характеризуется прогрессирующим деструктивным отложением

соединительной ткани на паренхиме почки, что неизбежно приводит к снижению функции почек независимо от первичного заболевания почек, вызывающего первичное повреждение почек. Так называемый эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), изменение клеточных характеристик, при котором тубулярные эпителиальные клетки трансформируются в мезенхимальные фибробласты, представляет собой основной механизм фиброза почек. Фиброз поражает почти все ткани и системы органов и может возникать как реакция репарации или замены на раздражитель, такой как повреждение ткани или воспаление. Нормальная физиологическая реакция на травму приводит к отложению соединительной ткани, но если этот процесс становится патологическим, замена высокодифференцированных клеток рубцовой соединительной тканью изменяет структуру и функцию ткани. На клеточном уровне эпителиальные клетки и фибробласты пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты, что приводит к сокращению матрикса, повышению ригидности, компрессии микрососудов и гипоксии. В настоящее время эффективных методов лечения или терапии фиброза не существует, однако исследования на животных и отдельные сообщения из исследований с участием человека позволяют предположить, что можно вызвать регрессию фиброзного повреждения ткани (Tampe and Zeisberg, Nat Rev Nephrol, vol 10:226-237, 2014).

Многие заболевания приводят к фиброзу, который вызывает прогрессирующую органную недостаточность, включая заболевания почек (например, хроническую болезнь почек, IgA-нефропатию, C3 гломерулопатию и другие гломерулонефриты), легких (например, идиопатический легочный фиброз, кистозный фиброз, бронхоэктаз), печени (например, цирроз, неалкогольную жировую болезнь печени), сердца (например, инфаркт миокарда, фиброз предсердий, фиброз клапанов, эндомиокардиальный фиброз), головного мозга (например, инсульт), кожи (например, избыточное заживление ран, склеродермия, системный склероз, келоиды), сосудистой системы (например, атеросклеротическое заболевание сосудов), кишечника (например, болезнь Крона), глаз (например, передняя субкапсулярная катаракта, помутнение задней капсулы), структур мягких тканей скелетно-мышечной системы (например, адгезивный капсулит, контрактура Дюпюитрена, миелофиброз), репродуктивных органов (например, эндометриоз, болезнь Пейрони) и некоторые инфекционные заболевания (например, короноавирус, альфа-вирус, гепатит С, гепатит В и т.д.).

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

(коллагенов, фибронектина, интегринов).

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

Было установлено, что чрезмерная активация комплемента является ключевым фактором, способствующим опосредованным иммунными комплексами, а также независимым от антител гломерулонефритам. Однако существует ряд убедительных подтверждений, демонстрирующих, что неконтролируемая активация комплемента in situ изначально вовлечена в патофизиологическое прогрессирование TI фиброза при негломерулярном заболевании (Quigg R.J, J Immunol 171:3319-3324, 2003, Naik A. et al., Semin Nephrol 33:575-585, 2013, Mathern D.R. et al., Clin J Am Soc Nephrol 10:P1636-1650, 2015). Сильные провоспалительные сигналы, которые запускает локальная активация комплемента, могут быть инициированы компонентами комплемента, которые фильтруются в проксимальных канальцах и затем попадают в интерстициальное пространство, или при аномальном синтезе компонентов комплемента тубулярными или другими резидентными и инфильтрирующими клетками, или измененной экспрессии регуляторных белков комплемента на клетках почек, или отсутствии, или в результатн мутаций с потерей или приобретением функции в регуляторных компонентах комплемента (Mathern D.R. et al., Clin J Am Soc Nephrol 10:P1636-1650, 2015, Sheerin N.S., et al., FASEB J 22: 1065-1072, 2008). Например, у мышей дефицит регуляторный белок комплемента CR1-родственного гена/белка y (Crry) приводит к активации тубулоинтерстициального (TI) комплемента с последующим воспалением и фиброзом, типичными для повреждений, наблюдаемых при TI заболеваниях у человека (Naik A. et al., Semin Nephrol 33:575-585, 2013, Bao L. et al., J Am Soc Nephrol 18:811-822, 2007). Воздействие анафилатоксина C3a на эпителиальные клетки канальцев приводит к эпителиально-мезенхимальному переходу (Tsang Z. et al., J Am Soc Nephrol 20:593-603, 2009). Недавно было показано, что блокирование сигнализации C3a только через рецептор C3a уменьшает TI фиброз почек у животных с протеинурией и без протеинурии (Tsang Z. et al., J Am Soc Nephrol20:593-603, 2009, Bao L. et al., Kidney Int. 80: 524-534, 2011).

Как описано в настоящем документе, авторы изобретения установили центральную роль лектинового пути в инициации и прогрессировании заболевания канальцевой почечной патологии, что предполагает ключевую роль активации лектинового пути в патофизиологии разнообразного ряда заболеваний почек, включая IgA-нефропатию, C3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты (Endo M. et al., Nephrol Dialysis Transplant 13: 1984-1990, 1998; Hisano S. et al., Am J Kidney Dis 45:295-302, 2005; Roos A. et al., J Am

Soc Nephrol 17: 1724-1734, 2006; Liu L.L. et al., Clin Exp. Immunol 174:152-160, 2013; Lhotta K. et al., Nephrol Dialysis Transplant 14:881-886, 1999; Pickering et al., Kidney International 84:1079-1089, 2013), диабетическую нефропатию (Hovind P. et al., Diabetes 54:1523-1527, 2005), ишемическое реперфузионное повреждение (Asgari E. et al., FASEB J 28:3996-4003, 2014) и отторжение трансплантата (Berger S.P. et al., Am J Transplant 5:1361-1366, 2005).

Как дополнительно описано в настоящем документе, авторы изобретения продемонстрировали, что ингибирование MASP-2 уменьшает воспаление и фиброз в моделях тубулоинтерстициального заболевания на мышах. Таким образом, ожидается, что ингибиторы MASP-2 будут полезны при лечении фиброза почек, включая тубулоинтерстициальное воспаление и фиброз, протеинурию, IgA-нефропатию, C3-гломерулопатию и другие гломерулонефриты, а также ишемическое реперфузионное повреждение почек.

Заболевание легких

Фиброз легких представляет собой образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в легких, при которой нормальная легочная ткань замещается фиброзной тканью. Такое рубцевание приводит к жесткости легких и нарушению структуры и функции легких. Считается, что у человека фиброз легких возникает в результате многократного повреждения ткани внутри и между мелкими воздушными мешочками (альвеолами) в легких. В экспериментальных условиях различные модели на животных воспроизводили аспекты заболевания человека. Например, чужеродный агент, такой как блеомицин, флуоресцеина изотиоцианат, диоксид кремния или асбест, можно вводить в трахею животного (Gharaee-Kermani et al., Animal Models of Pulmonary Fibrosis. MethodsMol. Med., 2005, 117:251-259).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ ингибирования фиброза легких у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением легких, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, таким как ОРДС, вызванный коронавирусом, включающий введение MASP-2-ингибирующего средства, такого как MASP-2-ингибирующее антитело, субъекту, нуждающемуся в этом. Данный способ включает введение композиции, включающей количество ингибитора MASP-2, эффективно для ингибирования фиброза легких, уменьшения фиброза легких и/или улучшения функции легких. Улучшение симптомов или функции легких включает улучшение функции и/или жизненной емкости легких, снижение утомляемости и улучшение сатурации кислородом.

MASP-2-ингибирующую композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного нанесения композиции во время хирургического вмешательства или местной инъекции, прямой или удаленной, например, с помощью катетера. В альтернативе MASP-2-ингибирующее средство можно вводить субъекту системно, например, путем внутриартериального, внутривенного, внутримышечного, ингаляционного, назального, подкожного или другого парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидергических средств. Введение

могут производить повторно по решению врача, пока состояние не разрешится или не станет контролируемым.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела) вводят в комбинации с одним или более средствами или методами лечения, подходящими для первичного заболевания или патологического состояния легких.

Инфекционные заболевания

Инфекционные заболевания, такие как коронавирус, и хронические инфекционные заболевания, такие как гепатит С и гепатит В, вызывают воспаление ткани и фиброз, при этом высокая активность лектинового пути может быть вредной. При таких заболеваниях могут быть полезными ингибиторы MASP-2. Например, МСЛ и уровни MASP-1, как было обнаружено, являются значимым показателем тяжести фиброза печени при инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС) (Brown et al., Clin Exp Immunol. 147(l):90-8, 2007; Saadanay et al., Arab J Gastroenterol. 12(2):68-73, 2011; Saeed et al., Clin Exp Immunol. 174(2):265-73, 2013). Как было показано ранее, MASP-1 является мощным активатором MASP-2 и лектинового пути (Megyeri et al., J Biol Chem. 29: 288(13):8922-34, 2013). Альфавирусы, такие как вирус чикунгунья и вирус Росс Ривер вызывают сильную воспалительную реакцию в организме-хозяине, приводящую к артриту и миозиту, при этом такая патология опосредована МСЛ и лектиновым путем (Gunn et al., PLoSPathog. 8(3):el002586, 2012).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ предотвращения, лечения, регрессии, ингибирования и/или уменьшения фиброза и/или воспаления у субъекта, страдающего или ранее страдавшего инфекционным заболеванием, таким как коронавирус или вирус гриппа, вызывающий воспаление и/или фиброз, включающий введение ингибитора MASP-2, такого как MASP-2-ингибирующее антитело, нуждающемуся в этом субъекту.

MASP-2-ингибирующую композицию можно вводить локально в область фиброза, например, путем местного введения композиции во время операции или путем местной инъекции, прямой или удаленной, например, с помощью катетера. В альтернативе ингибитор MASP-2 можно вводить субъекту системно, например, путем внутриартериального, внутривенного, внутримышечного, ингаляционного, назального, подкожного или другого парентерального введения, или, возможно, путем перорального введения в случае непептидэргических средств. Введение могут производить повторно по решению врача, пока состояние не разрешится или не станет контролируемым.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела) вводят в комбинации с одним или больше средствами или методами лечения, соответствующими первичному инфекционному заболеванию.

В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание, вызывающее воспаление и/или фиброз, выбрано из группы, состоящей из: коронавируса, альфавируса,

гепатита А, гепатита В, гепатита С, туберкулеза, ВИЧ и гриппа.

В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела или MASP-2-ингибирующие низкомолекулярные соединения) вводят в комбинации с одним или больше средствами или методами лечения, соответствующими первичному заболеванию или нарушению.

В некоторых вариантах осуществления любого из различных методов и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, MASP-2-ингибирующее антитело или низкомолекулярное соединение селективно блокирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь.

IV. MASP-2-ИНГИБИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

В различных аспектах настоящего изобретения предложены способы ингибирования нежелательных эффектов фиброза и/или воспаления, включающие ыыедение ингибитора MASP-2 нуждающемуся в этом субъекту. MASP-2-ингибирующие средства вводят в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у живого субъекта. При практической реализации данного аспекта изобретения репрезентативные MASP-2-ингибирующие средства включают: молекулы, ингибирующие биологическую активность MASP-2 (такие как низкомолекулярные ингибиторы, антитела против MASP-2 (например, MASP-2-ингибирующие антитела) или блокирующие пептиды, взаимодействующие с MASP-2 или нарушающие белок-белковое взаимодействие), и молекулы, которые снижают экспрессию MASP-2 (такие как молекулы MASP-2 антисмысловых нуклеиновых кислот, MASP-2-специфичные молекулы РНКи и MASP-2 рибозимы), что препятствует активации MASP-2 лектинового пути комплемента. MASP-2-ингибирующие средства могут применяться отдельно в качестве основной терапии или в комбинации с другой терапией в качестве адъювантной терапии, для улучшения терапевтической эффективности других медицинских методов лечения.

Ингибирование MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компоненте системы комплемента, которое происходит в результате введения ингибитора MASP-2 в соответствии со способами изобретения: ингибирование образования или продукции продуктов системы MASP-2-зависимой активации комплемента, C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (МАК) (измеренных, например, как описано в Примере 2), уменьшение расщепления C4 и депонирования C4b (измеренных, например, как описано в Примере 2), или уменьшение расщепления C3 и депонирования C3b (измеренных, например, как описано в Примере 2).

Согласно настоящему изобретению применяют MASP-2-ингибирующие средства, которые эффективно ингибируют респираторный дистресс-синдром (или указанным другим названием, улучшая дыхательную функцию) у субъекта, инфицированного коронавирусом.

Оценку дыхательной функции можно проводить периодически, например, каждый час, каждый день, каждую неделю или каждый месяц. Такую оценку предпочтительно

проводят в нескольких моментах времени для данного субъекта или в одном или больше моментах времени для данного субъекта и здорового субъекта из контрольной группы. Оценку могут проводить с регулярной периодичностью, например, каждый час, каждый день, каждую неделю или каждый месяц. Если одна оценка привела к обнаружению уменьшения респираторного дистресс-синдрома (т.е. повышению дыхательной функции), то считается, что MASP-2 ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело, является эффективным для лечения субъекта, страдающего острым респираторным дистресс-синдромом, вызванным коронавирусом.

MASP-2-ингибирующие средства, подходящие для практической реализации данного аспекта изобретения, включают, например, антитела к MASP-2 и их фрагменты, MASP-2-ингибирующие пептиды, малые молекулы, растворимые рецепторы MASP-2 и ингибиторы экспрессии. MASP-2-ингибирующие средства могут ингибировать MASP-2-зависимую систему активации комплемента, блокируя биологическую функцию MASP-2. Например, ингибирующее средство может эффективно блокировать межбелковые взаимодействия MASP-2, препятствовать димеризации или сборке MASP-2, блокировать связывание Ca^{2+}, блокировать активный центр сериновой протеазы MASP-2 или может снижать экспрессию белка MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы MASP-2 селективно ингибируют активацию комплемента MASP-2, оставляя C1q-зависимую систему активации комплемента функционально интактной.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство, применимое в способах согласно изобретению, представляет собой специфичное MASP-2-ингибирующее средство, которое специфично связывается с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью по меньшей мере в десять раз более высокой, чем с другими антигенами в системе комплемента. В другом варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство специфично связывается с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью связывания по меньшей мере в 100 раз более высокой, чем с другими антигенами в системе комплемента. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство специфично связывается по меньшей мере с одним из (i) CCP1-CCP2 домена (ак 300-431 SEQ ID NO:6) или домена сериновой протеазы MASP-2 (ак 445-682 SEQ ID NO:6) и ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, который специфично связывается с MASP-2. Аффинность связывания MASP-2-ингибирующего средства можно определить с помощью подходящего анализа связывания.

Полипептид MASP-2 имеет молекулярную структуру, сходную с MASP-1, MASP-3 и C1r и C1s, протеазами C1 системы комплемента. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO:4, кодирует репрезентативный пример MASP-2 (состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:5) и дает полипептид MASP-2 человека с лидерной последовательностью (ак 1-15), которая отщепляется после секреции, что

приводит к образованию зрелой формы MASP-2 человека (SEQ ID NO:6). Как показано на ФИГУРЕ 2, ген MASP 2 человека включает двенадцать экзонов. кДНК MASP-2 человека кодируется экзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K и L. В результате альтернативного сплайсинга образуется белок массой 20 кДа, называемый МСЛ-ассоциированным белком 19 ("MAp19", также называемый "sMAP") (SEQ ID NO:2), кодируемый (SEQ ID NO:1), образующийся с экзонов B, C, D и E, как показано на ФИГУРЕ 2. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO:50, кодирует MASP-2 мыши (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:51) и дает полипептид MASP-2 мыши с лидерной последовательностью, которая отщепляется после секреции, что приводит к образованию зрелой формы мышиного MASP-2 (SEQ ID NO:52). Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO:53, кодирует MASP-2 крысы (состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:54) и дает полипептид MASP-2 крысы с лидерной последовательностью, которая отщепляется после секреции, что приводит к образованию зрелой формы MASP-2 крысы (SEQ ID NO:55).

Специалистам в данной области техники понятно, что последовательности, раскрытые в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:53, представляют собой отдельные аллели MASP-2 человека, мыши и крысы соответственно, и что ожидается возникновение аллельной вариации и альтернативного сплайсинга. Аллельные варианты нуклеотидных последовательностей, показанные в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:53, включая такие, которые содержат молчащие мутации, и такие, в которых мутации приводят к изменениям аминокислотной последовательности, включены в объем настоящего изобретения. Аллельные варианты последовательности MASP-2 могут быть клонированы путем зондирования кДНК или геномных библиотек разных лиц в соответствии со стандартными методиками.

Домены белка MASP-2 человека (SEQ ID NO:6) показаны на ФИГУРЕ 1 и 2A и включают N-концевой домен C1r/C1s/Vegf морского ежа/костного морфогенетического белка (CUBI) (ак 1-121 последовательности SEQ ID NO:6), эпидермальному фактор роста-подобный домен (ак 122-166), второй домен CUBI (ак 167-293), а также тандем доменов контролирующего белка комплемента и домен сериновой протеазы. Альтернативный сплайсинг гена MASP 2 приводит к MAp19, показанному на ФИГУРЕ 1. MAp19 представляет собой неферментативный белок, содержащий N-концевую область CUBI-EGF MASP-2 с четырьмя дополнительными остатками (EQSL), полученными из экзона E, как показано на ФИГУРЕ 1.

Было показано, что некоторые белки связываются или взаимодействуют с MASP-2 посредством белок-белковых взаимодействий. Например, MASP-2, как известно, связывается с и образует Ca^{2+}-зависимые комплексы с лектиновыми белками МСЛ, H-фиколином и L-фиколином. Каждый MASP-2/лектиновый комплекс, как было показано, активирует комплемент путем MASP-2-зависимого расщепления белков C2 и C4 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Исследования показали,

что CUB1-EGF домены MASP-2 необходимы для ассоциации MASP-2 с МСЛ (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Также было показано, что домены CUBIEGFCUII опосредуют димеризацию MASP-2, которая необходима для образования активного комплекса МСЛ (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Таким образом, могут быть идентифицированы MASP-2-ингибирующие средства, которые связывают или блокируют области-мишени MASP-2, которые, как известно, важны для MASP-2-зависимой активации комплемента.

ИНГИБИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ MASP-2

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, MASP-2-ингибирующее средство включает антитело против MASP-2, ингибирующее MASP-2-зависимую систему активации комплемента. Антитела против MASP-2, полезные в данном аспекте изобретения, включают поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела, полученные из любого млекопитающего, продуцирующего антитела, и могут быть мультиспецифичными, химерными, гуманизированными, антиидиотипическими и фрагментами антитела. Фрагменты антитела включают Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fv фрагменты, scFv фрагменты и одноцепочечные антитела, как дополнительно описано в настоящем документе.

Антитела MASP-2 можно подвергать скринингу на способность ингибировать MASP-2-зависимую систему активации комплемента и на противофиброзную активность и/или способность ингибировать повреждение почек, связанное с протеинурией или Адриамицин-индуцированной нефропатией с помощью анализов, описанных в настоящем документе. Несколько антител к MASP-2 были описаны в литературе, и некоторые недавно были получены, некоторые из которых указаны ниже в ТАБЛИЦЕ 1. Например, как описано в Примерах 10 и 11 в настоящем документе, были идентифицированы Fab2 антитела против MASP-2, которые блокируют MASP-2-зависимую активацию комплемента. Как описано в Примере 12, а также описано в заявке WO2012/151481, которая включена в настоящий документ посредством отсылки, были идентифицированы полностью человеческие scFv антитела к MASP-2 (например, OMS646), которые блокируют MASP-2-зависимую активацию комплемента. Как описано в Примере 13, а также описал в заявке WO2014/144542, которая включена в настоящий документ посредством отсылки, отношение несущие пептид SGMI-2 антитела к MASP-2 и их фрагменты с MASP-2-ингибирующей активностью были созданы путем слияния аминокислотной последовательности пептида SGMI-2 (SEQ ID NO:72, 73 или 74) с N- или С-концом тяжелой и/или легкой цепей человеческого антитела к MASP-2 (например, OMS646-SGMI-2).

Таким образом, в одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 для применения в способах изобретения включает человеческое антитело, такое как, например, OMS646. Таким образом, в одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 для применения в композициях и способах заявленного изобретения включает человеческое антитело, которое связывает полипептид, состоящий из MASP-2 человека

(SEQ ID NO:6), где антитело включает: (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 31-35 из SEQ ID NO:67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 50-65 из SEQ ID NO:67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 95-107 из ID NO:67 и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) CDR-L1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 24-34 из SEQ ID NO:69; и ii) CDR-L2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 50-56 из SEQ ID NO:69; и iii) CDR-L3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 89-97 из SEQ ID NO:69, или (II) их вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:67) и вариабельную область легкой цепи с по меньшей мере 90% идентичностью (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей некоторое количество MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на MASP-2 человека, распознаваемого референсным антителом OMS646, включающим вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 для применения в способах согласно изобретению включает человеческое антитело OMS646.

ТАБЛИЦА 1: ПРИМЕРЫ MASP-2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

АНТИГЕН	**ТИП АНТИТЕЛА**	**ССЫЛКА**
Рекомбинантный MASP-2	Поликлональное крысиное	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000
Рекомбинантный фрагмент CCP1/2-SP человека (мАт 8B5)	Крысиное мАт (подкласса IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
Рекомбинантный человеческий MAp19 (мАт 6G12) (перекрестно	Крысиное мАт (подкласса IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003

АНТИГЕН	ТИП АНТИТЕЛА	ССЫЛКА
реагирует с MASP-2)		
hMASP-2	Мышиное мАт (S/P) Мышиное мАт (N-кон)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP домен	крысиное мАт: Nimoab 101, продуцируемое гибридомной клеточной линией 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (полноразмерный-his-меченный)	мышиные мАт: NimoAb104, продуцируемое гибридомной клеточной линией M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, продуцируемое гибридомной клеточной линией M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109, продуцируемое гибридомной клеточной линией M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110, продуцируемое гибридомной клеточной линией M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384
Крысиный MASP-2 (полноразмерный)	Фрагменты Fab2 антитела к MASP-2	Пример 10
hMASP-2 (полноразмерный)	Полностью человеческие клоны scFv	Пример 12 и WO2012/151481
hMASP-2 (полноразмерный)	Несущие пептид SGMI-2 антитела к MASP-2	Пример 13 и WO2014/144542

АНТИТЕЛА ПРОТИВ MASP-2 СО СНИЖЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения антитело против MASP-2 обладает сниженной эффекторной функцией для уменьшения воспаления, которое может возникать в результате активации классического пути комплемента. Способность молекул IgG инициировать классический путь комплемента, как было показано, сосредоточена в Fc-части молекулы (Duncan, A.R., et al., Nature 332:738-740 1988). Молекулы IgG, в которых Fc-часть молекулы была удалена путем ферментативного расщепления, лишены этой эффекторной функции (см. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Таким образом, антитела со сниженной эффекторной функцией могут быть получены в результате потери Fc-части молекул при получении генно-инженерно модифицированной Fc последовательности,

которая обладает минимальной эффекторной функцией или относится к изотипу IgG_2 или IgG_4 человека.

Антитела со сниженной эффекторной функцией могут быть получены с помощью стандартных манипуляций молекулярной биологии с Fc-частью тяжелой цепи IgG, как описано в настоящем документе, а также описано в публикациях Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol, 10:241-250, 1993, и Rodrigues et al., J. Immunol 151:6954-6961, 1998. Антитела со сниженной эффекторной функцией также включают изотипы IgG2 и IgG4 человека, которые обладают сниженной способностью к активации комплемента и/или взаимодействию с Fc-рецепторами (Ravetch, J.V., et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991 ; Isaacs, J.D., et al., J. Immunol 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., Immunol Today 14:215-221, 1993). Гуманизированные или полностью человеческие антитела, специфические к MASP-2 человека, состоящие из изотипов IgG2 или IgG4, могут быть получены на основе одного из нескольких способов, известных среднему специалисту в данной области, как описано в Vaughan, T.J., et al, Nature Bioiechnical 16:535-539, 1998.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ MASP-2

Антитела против MASP-2 могут быть получены с использованием полипептидов MASP-2 (например, полноразмерного MASP-2) или с использованием антигенных пептидов, несущих эпитоп MASP-2 (например, часть полипептида MASP-2). Иммуногенные пептиды могут содержать не больше пяти аминокислотных остатков. Например, полипептид MASP-2, включающий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, может использоваться для индукции антител против MASP-2, применимых в способе согласно изобретению. Конкретные домены MASP-2, которые, как известно, участвуют в белок-белковых взаимодействиях, такие как CUBI и CUBIEGF домены, а также область, охватывающую активный центр сериновой протеазы, можно экспрессировать в виде рекомбинантных полипептидов, как описано в Примере 3, и использовать в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, включающие часть по меньшей мере из 6 аминокислот полипептида MASP-2 (SEQ ID NO:6), также можно использовать для индукции антител к MASP-2. Дополнительные примеры антигенов MASP-2, которые можно использовать для индукции антител к MASP-2, приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 2. Пептиды и полипептиды MASP-2, используемые для получения антител, могут быть выделены в качестве природных полипептидов, или рекомбинантных или синтетических пептидов, а также каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов, таких как MASP-2A, как дополнительно описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения антитела против MASP-2 получают с использованием линии трансгенных мышей, как описано в настоящем документе.

Антигены, подходящие для получения антител против MASP-2, также включают слитые полипептиды, такие как слитые конструкции MASP-2 или его части с иммуноглобулиновым полипептидом или с мальтоза-связывающим белком. Полипептидный иммуноген может быть полноразмерной молекулой или ее частью. Если

полипептидная часть является гаптеноподобной, то такую часть можно успешно объединять или соединять с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин лимфы морского блюдечка (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или столбнячный анатоксин) для иммунизации.

ТАБЛИЦА 2: АНТИГЕНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ MASP-2

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**
SEQ ID NO:6	Белок MASP-2 человека
SEQ ID NO:51	белок MASP-2 мыши
SEQ ID NO:8	Домен CUBI MASP-2 человека (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домены CUBIEGF MASP-2 человека (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домены CUBIEGFCUBII MASP-2 человека (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Домен EGF MASP-2 человека (ак 122-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:12	Домен сериновой протеазы MASP-2 человека (ак 429-671 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	Мутантная форма инактивированной сериновой протеазы (ак 610-625 из SEQ ID NO:6 с мутацией Ser 618)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	Пептид CUBI человека
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCE YDFVKLSSGAKVLATLCGQ	Пептид CUBI человека
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	МСЛ-связывающая область в домене CUBI человека
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	МСЛ-связывающая область в домене CUBI человека
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	Пептид EGF
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGG ALV	Пептид из активного центра сериновой протеазы

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Поликлональные антитела против MASP-2 могут быть получены путем иммунизации животного полипептидом MASP-2 или его иммуногенной частью с использованием способов, которые хорошо известны среднему специалисту в данной области. См., например, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", в Immunochemical Protocols (Manson, ed.), стр. 105. Иммуногенность полипептида MASP-2 может быть увеличена за счет использования адъювантов, в том числе неорганических гелей, таких как гидроксид алюминия или адъювант Фрейнда (полный или неполный), поверхностно-активных веществ, такие как лизолецитин, полиолы плюроник, полианионы, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы морского блюдечка и динитрофенол. Поликлональные антитела обычно индуцируют в животных, таких как лошади, коровы, собаки, курицы, крысы, мыши, кролики, морские свинки, козы или овцы. В альтернативе антитело против MASP-2, применимое в настоящем изобретении, также может быть получено из

человекообразной обезьяны. Общие способы индукции диагностически и терапевтически полезных антител в бабуинах можно найти, например, в Goldenberg et al., международная заявка на патент WO 91/11465, а также в Losman, M.J., et al., Int. J, Cancer 46:310, 1990. Сыворотки, содержащие иммунологически активные антитела, затем получают из крови таких иммунизированных животных с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело против MASP-2. Моноклональные антитела против MASP-2 обладают высокой специфичностью, будучи направленными против одного эпитопа MASP-2. При использовании в настоящем документе определение "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного по существу из гомогенной популяции антител, и не может рассматриваться как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой технологии, которая обеспечивает получение молекул антитела с использованием непрерывных клеточных линий в культуре, например, гибридомного метода, описанного в публикации Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975, или они могут быть получены при использовании методов рекомбинантных ДНК (см., например, патент США 4,816,567 за авторством Cabilly), Моноклональные антитела могут быть выделены из фаговых библиотек антител при использовании методов, описанных в 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 любой их подкласс.

Например, моноклональные антитела могут быть получены путем инъекции подходящему млекопитающему (например, мыши BALB/c) композиции, включающей полипептид MASP-2 или его часть. После заданного периода времени у мыши забирают спленоциты и суспендируют их в среде для культивирования клеток. Затем спленоциты сливают с бессмертной линией клеток с получением гибридомы. Образовавшиеся гибридомы выращивают в культуре клеток и отирают по способности продуцировать моноклональное антитело против MASP-2. Примеры, дополнительно описывающие получение моноклональных антител против MASP-2, приводены в настоящем документе (см. также Current Protocols in Immunology, Vol. 1., John Wiley & Sons, стр. 2.5.1-2.6.7, 1991).

Моноклональные антитела человека могут быть получены при использовании трансгенных мышей, которые были генно-инженерно модифицированы для продукции специфических человеческих антител в ответ на стимуляцию антигеном. В этой методике элементы локуса тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина вводят в линии мышей, полученных из линии эмбриональных стволовых клеток, которые содержат направленные прерывания эндогенных локусов тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела,

специфичные в отношении человеческих антигенов, таких как антигены MASP-2, описанные в настоящем документе, при этом такие мыши могут использоваться для получения гибридом, секретирующих человеческое антитело к MASP-2, путем слияния B-клеток таких животных с подходящими линиями миеломных клеток с использованием стандартной технологии Колера-Мильштейна, как дополнительно описано в настоящем документе. Трансгенные мыши с геномом человеческих иммуноглобулинов доступны в продаже (например, в Abgenix, Inc., Fremont, CA и Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Способы получения человеческих антител в трансгенных мышах описаны, например, в публикациях Green, L.L., et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., Nature 355:856, 1994; и Taylor, L.D., et al., Int. Immun. 6:579, 1994.

Моноклональные антитела могут быть выделены и очищены из гибридомных культур при помощи множества хорошо зарекомендовавших себя способов. Такие способы выделения включают аффинную хроматографию на сефарозе с белком A, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию (см., например, Coligan на стр. 2.7.1-2.7.12 и стр. 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of immunoglobulin G (IgG)", в Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol., 10, стр. 79-104, 1992).

После получения поликлональные, моноклональные или полученных в фаговых библиотеках антитела сначала тестируют на специфичность связывания с MASP-2. Различные анализы, известные специалистам в данной области, могут использоваться для обнаружения антител, которые специфично связываются с MASP-2. Примеры таких анализов включают: Вестерн-блоттинг или иммунопреципитационный анализ с использованием стандартных методов (например, как описано в Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, ИФА, дот-блоты, анализы ингибирования или конкурентные анализы и сэндвич-анализы (как описано в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После обнаружения антител, которые специфично связываются с MASP-2, антитела против MASP-2 тестируют на способность функционировать в качестве MASP-2-ингибирующего средства в одном из нескольких анализов, таких как, например, анализ лектин-специфического расщепления C4 (описан в Примере 2), анализ отложения C3b (описан в Примере 2) или анализ отложения C4b (описан в Примере 2).

Аффинность моноклональных антител против MASP-2 сможет легко определить средний специалист в данной области (см., например, Scatchard, A., NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949). В одном варианте осуществления моноклональные антитела против MASP-2, применимые в способах согласно изобретению, связываются с MASP-2 с аффинностью связывания <100 нМ, предпочтительно <10 нМ и наиболее предпочтительно <2 нМ.

ХИМЕРНЫЕ/ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА

Моноклональные антитела, применимые в способе согласно изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из определенных биологических видов или относящихся к определенному классу или

подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из другого биологического вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител (патент США 4,816,567 за авторством Cabilly; и Morrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).

Одной из форм химерного антитела, применимых в изобретении, является гуманизированное моноклональное антитело против MASP-2. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела получают путем переноса нечеловеческих (например, мышиных) определяющих комплементарность областей (CDR) из вариабельных областей тяжелых и легких цепей мышиного иммуноглобулина в человеческий вариабельный домен. Как правило, остатки человеческих антител в каркасных областях затем заменяют нечеловеческими аналогами. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не присутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Такие модификации вводят в целях дальнейшего улучшения эффективности антитела. Обычно гуманизированное антитело включает по существу все из по меньшей мере одной, и, как правило, двух вариабельных областей, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все Fv каркасные области являются каркасными областями из последовательности еловеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Для получения дополнительной информации см. Jones, P.T, et al., Nature 321:522-525, 1986; Reicbmann, L., et al., Nature 332:323-329, 1988; и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992.

Гуманизированные антитела, применимые в изобретении, включают человеческие моноклональные антитела, включающие, по меньшей мере, MASP-2-связывающую CDRH3-область. Кроме того, Fc-части могут быть заменены так, чтобы были получены IgA или IgM, или же IgG-антитела человека. Такие гуманизированные антитела будут обеспечивать особую клиническую пользу, поскольку будут специфично распознавать MASP-2 человека, но не будут вызывать иммунный ответ на само антитело в организме человека. Следовательно, они лучше подходят для введения in vivo человеку, особенно если необходимо повторное или длительное введение.

Пример создания гуманизированного антитела против MASP-2 из мышиного моноклонального антитела против MASP-2 предоставлен в настоящем документе в Примере 6. Технологии получения гуманизированных моноклональных антител также описаны, например, в пуюликациях Jones, P.T, et al Jones, P.T., et al., Nature 327:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 59:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech.

72:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 750:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", в Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., стр. 399-434, 1996; и в патенте США 5,693,762 за авторством Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые синтезируют гуманизированные антитела из участков специфических мышиных антител, такие как Protein Design Labs (Mountain View, CA).

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА

Антитела против MASP-2 также могут быть созданы при использовании рекомбинантных методов. Например, человеческие антитела могут быть созданы при использовании экспрессионных библиотек иммуноглобулинов человека (доступных, например, в Stratagene, Corp., La Jolla, CA) с получением фрагментов человеческих антител (VH, VL, Fv, Fd, Fab или $F(ab')_2$). Эти фрагменты затем используют для конструирования цельных человеческих антител при использовании способов, аналогичных способам получения химерных антител.

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

После идентификации антител против MASP-2 с требуемой ингибирующей активностью, такие антитела можно использовать для создания антиидиотипических антител, которые похожи на часть MASP-2, при использовании методов, которые хорошо известны в данной области. См., например, Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993. Например, антитела, которые связываются с MASP-2 и конкурентно ингибируют белковое взаимодействие MASP-2, необходимое для активации комплемента, могут использоваться для создания антиидиотипов, которые похожи на МСЛ-связывающий участок на белке MASP-2 и, следовательно, связывают и нейтрализуют связывающий лиганд MASP-2, такой как, например, МСЛ.

ФРАГМЕНТЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

MASP-2-ингибирующие средства, применимые в способе согласно изобретению, охватывают не только интактные молекулы иммуноглобулинов, но и известные фрагменты, включающие Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител.

Из уровня техники хорошо известно, что только малая часть молекулы антитела, паратоп, участвует в связывании антитела со своим эпитопом (см., например, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Области pFc' и Fc антитела являются эффекторами классического пути комплемента, но не участвуют в связывании антигена. Антитело, из которого была ферментативно удалена pFc'-область, или которое было получено без pFc'-области, обозначается как $F(ab')_2$ фрагмент и сохраняет оба антигенсвязывающих участка интактного антитела. Выделенный $F(ab')_2$ фрагмент называется бивалентным моноклональным фрагментом из-за присутствия двух антигенсвязывающих участков. Аналогичным образом, антитело, из

которого была ферментативно удалена Fc-область, или которое было получено без Fc-области, обозначается Fab-фрагментом и сохраняет один из антигенсвязывающих участков интактной молекулы антитела.

Фрагменты антител могут быть получены при протеолитическом гидролизе, например, при расщеплении пепсином или папаином цельных антител стандартными методами. Например, фрагменты антител могут быть получены при ферментативном расщеплении антител пепсином с получением 5S фрагмента, обозначаемого $F(ab')_2$. Этот фрагмент можно далее расщеплять с использованием тиольного восстановителя с получением моновалентных 3,5S Fab' фрагментов. Необязательно реакцию расщепления можно проводить с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые образуются при разрыве дисульфидных связей. В альтернативе ферментативное расщепление пепсином дает два моновалентных Fab-фрагмента и Fc-фрагмент непосредственно. Эти способы описаны, например, в патенте США 4,331,647 за авторством Goldenberg; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., в Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; и Coligan на стр. 2.8.1-2.8.10 и 2.10.-2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления применение фрагментов антител без Fc-области предпочтительно, чтобы избежать активации классического пути комплемента, которая инициируется при связывании Fc с Fcγ-рецептором. Существует несколько способов, с помощью которых можно получать мАт, которое исключает взаимодействия с Fcγ-рецептором. Например, Fc-область моноклонального антитела можно удалять химически при использовании частичного расщепления протеолитическими ферментами (например, расщепления фицином) с образованием, например, антигенсвязывающих фрагментов антитела, таких как Fab или $F(ab)_2$-фрагменты (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991). В альтернативе изотип γ4 IgG человека, который не связывается с Fcγ-рецепторами, можно использовать при конструировании гуманизированных антител, как это описано в настоящем документе. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, которые не имеют Fc-домена, также могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных технологий, описанных в настоящем документе.

ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ

В альтернативе можно создавать связывающие молекулы с одной пептидной цепью, специфичные к MASP-2, в которых Fv-области тяжелой и легкой цепи соединены. Fv-фрагменты могут быть соединены пептидным линкером с образованием одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Такие одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают путем конструирования структурного гена, включающего последовательности ДНК, кодирующие V_H и V_L домены, которые соединены олигонуклеотидом. Структурный ген встраивают в вектор экспрессии, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как E. coli. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют одну полипептидную цепь с линкерным пептидом, соединяющим два V-

домена. Способы получения scFv-фрагментов описаны, например, в Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzyrnology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; патенте США 4,946,778 за авторством Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993.

В качестве иллюстративного примера MASP-2-специфичный scFv может быть получен при контакте лимфоцитов с полипептидом MASP-2 in vitro и отборе из библиотек дисплея антител в фаговых векторах или аналогичных векторах (например, при использовании иммобилизованного или меченого белка или пептида MASP-2). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные MASP-2-полипептид-связывающие домены, могут быть получены при скрининге библиотек случайных пептидов, экспонированных на фаге или на бактериях, таких как E. coli. Такие библиотеки дисплея случайных пептидов могут использоваться для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с MASP-2. Методы создания и скрининга таких библиотек дисплея случайных пептидов известны в уровне техники (патент США 5,223,409 за авторством Ladner; патент США 4,946,778 за авторством Ladner; патент США 5,403,484 за авторством Ladner; патент США 5,571,698 за авторством Ladner; и Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996), при этом библиотеки дисплея случайных пептидов и наборы для скрининга таких библиотек доступны в продаже, например, в CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif), New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Mass.), и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Еще одной формой фрагмента антитела против MASP-2, применимого в данном аспекте изобретения, является пептид, кодирующий одну определяющую комплементарность область (CDR), которая связывается с эпитопом на антигене MASP-2 и ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента. CDR-пептиды ("минимальные распознающие единицы") могут быть получены путем конструирования генов, кодирующих CDR представляющего интерес антитела. Такие гены получают, например, с помощью полимеразной цепной реакции для синтеза вариабельной области с РНК антитело-продуцирующих клеток (см., например, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", в Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), стр. 166, Cambridge University Press, 1995; и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", в Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), стр. 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Антитела к MASP-2, описанные в настоящем документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство является высокоаффинным человеческим или гуманизированным моноклональным антителом против MASP-2 со сниженной эффекторной функцией.

ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения MASP-2-ингибирующее средство включает выделенные пептидные ингибиторы MASP-2, в том числе выделенные природные пептидные ингибиторы и синтетические пептидные ингибиторы, которые ингибируют MASP-2-зависимую активацию системы комплемента. В настоящем документе термин "выделенные пептидные ингибиторы MASP-2" относится к пептидам, которые ингибируют MASP-2-зависимую активацию комплемента при связывании, конкуренции с MASP-2 за связывание с другой распознающей молекулой (например, МСЛ, H-фиколином, M-фиколином или L-фиколином) в лектиновом пути, и/или непосредственно взаимодействующих с MASP-2, ингибируя MASP-2-зависимую активацию комплемента, которые являются по существу чистыми и по существу не содержат других веществ, с которыми они могут быть обнаружены в природе, до степени, целесообразной и соответствующей их предполагаемому применению.

Пептидные ингибиторы успешно применялись in vivo для блокирования белок-белковых взаимодействий и каталитических центров. Например, пептидные ингибиторы молекул адгезии, структурно родственных LFA-1, недавно были одобрены для применения в клинической практике при коагулопатиях (Ohman, E.M., et al, European Heart J. 16:50-55, 1995). Были описаны короткие линейные пептиды (<30 аминокислот), которые блокируют или нарушают интегрин-зависимую адгезию (Murayama, O. Et al., J. Biochem. 120:445-51, 1996). Более длинные пептиды, длиной от 25 до 200 аминокислотных остатков, успешно применяются для блокирования интегрин-зависимой адгезии (Zhang, L., et al., J. Biol. Chem. 271(47):29953-57, 1996). Как правило, более длинные пептидные ингибиторы обладают более высокой аффинностью и/или более низкой скоростью диссоциации, чем короткие пептиды, и, следовательно, могут быть более мощными ингибиторами. Также было показано, что циклические пептидные ингибиторы являются эффективными ингибиторами интегринов in vivo для лечения воспалительного заболевания у человека (Jackson, D.Y., et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). Один из способов получения циклических пептидов включает синтез пептидов, имеющих в качестве концевых аминокислот цистеины, что позволяет такому пептиду существовать в циклической форме за счет образования дисульфидных связей между концевыми аминокислотами, что, как было показано, улучшает аффинность и увеличивает полупериод существования in vivo для лечения гемопоэтических новообразований (например, патент США 6,649,592 за авторством Larson).

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ MASP-2

MASP-2-ингибирующие пептиды, применимые в способах данного аспекта изобретения, представлены аминокислотными последовательностями, которые имитируют области-мишени, важные для функции MASP-2. Ингибирующие пептиды, применимые при практической реализации способов согласно изобретению, имеют размер от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 300 аминокислот. В ТАБЛИЦЕ 3 приводен список иллюстративных ингибирующих пептидов, которые могут применяться при практической реализации данного аспекта изобретения. Кандидатный MASP-2-

ингибирующий пептид можно протестировать на способность действовать в качестве MASP-2-ингибирующего средства в одном из нескольких анализов, включая, например, анализ лектин-специфического расщепления C4 (описанный в Примере 2) и анализ отложения C3b (описанный в Примере 2).

В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие пептиды получают из полипептидов MASP-2 и выбирают из полноразмерного зрелого белка MASP-2 (SEQ ID NO:6) или из конкретного домена белка MASP-2, такого как, например, домен CUBI (SEQ ID NO:8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO:9), домен EGF (SEQ ID NO:11) и домен сериновой протеазы (SEQ ID NO:12). Как описано ранее, было показано, что области CUBEGFCUBII необходимы для димеризации и связывания с МСЛ (Thielens et al., выше). В частности, было показано, что пептидная последовательность TFRSDYN (SEQ ID NO:16) в домене CUBI MASP-2 участвует в связывании с МСЛ, в исследовании, которое позволило выявить человека, несущего гомозиготную мутацию с заменой Asp-105 на Gly-105, которая приводит к потере MASP-2 из МСЛ-комплекса (Stengaard-Pedersen, K., et at. New England J. Med. 349:554-560, 2003).

В некоторых вариантах осуществления MASP-2 ингибирующие пептиды получают из лектиновых белков, которые связываются с MASP-2 и участвуют в лектиновом пути комплемента. Было идентифицировано несколько различных лектинов, которые участвуют в этом пути, в том числе маннансвязывающий лектин (МСЛ), L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M. et al., J. Immunol, 168:3502-3506, 2002). Эти лектины присутствуют в сыворотке крови в виде олигомеров из гомотримерных субъединиц, каждая из которых имеет N-концевые коллаген-подобные волокна с углеводными распознающими доменами. Эти различные лектины, как было показано, связываются с MASP-2, и комплекс лектин/MASP-2 активирует комплемент путем расщепления белков C2 и C4. H-фиколин содержит N-концевую область длиной 24 аминокислоты, коллаген-подобный домен с 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, шеечный домен длиной 12 аминокислот и фибриноген-подобный домен длиной 207 аминокислот (Matsushita, M., et al., J. Immunol 168:3502-3506, 2002). H-фиколин связывается с GlcNAc и агглютинирует эритроциты человека, покрытые ЛПС, полученным из S. typhimurium, S. minnesota и E. coli. Было показано, что H-фиколин ассоциирован с MASP-2 и Map19 и активирует лектиновый путь. Id. L-фиколин/P35 также связывается с GlcNAc и, как было показано, ассоциирован с MASP-2 и MAp19 в человеческой сыворотке крови, и было показано, что данный комплекс активирует лектиновый путь (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). Соответственно, MASP-2 ингибирующие пептиды, применимые в настоящем изобретении, могут включать область по меньшей мере из 5 аминокислот, выбранных из белка МСЛ (SEQ ID NO:21), белка H-фиколина (номер доступа в Genbank NM_173452), белка M-фиколина (номер доступа в Genbank O00602) и белка L-фиколина (номер доступа в Genbank NM_015838).

В частности, ученые установили, что MASP-2-связывающий участок МСЛ

находится в пределах 12 триплетов Gly-X-Y "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO:26), который лежит между шарниром и шейкой в С-концевой части коллаген-подобного домена МСБ (Wallis, R. et al., J. BiolChem, 279:14065, 2004). Эта область MASP-2-связывающего участка также высококонсервативна в Н-фиколине человека и L-фиколине человека. Был описан консенсусный связывающий участок, который присутствует во всех трех лектиновых белках, включающий аминокислотную последовательность "OGK-X-GP" (SEQ ID NO:22), где буква "О" обозначает гидроксипролин, а буква "X" обозначает гидрофобный остаток (Wallis et al., 2004, выше). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие пептиды, применимые в данном аспекте изобретения, имеют длину по меньшей мере 6 аминокислот и включают SEQ ID NO:22. Было показано, что пептиды, полученные из МСЛ, которые включают аминокислотную последовательность "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO:24), связывают MASP-2 in vitro (Wallis, et al., 2004, выше). Для улучшения связывания с MASP-2 могут быть синтезированы пептиды, которые фланкированы двумя триплетами GPO на каждом конце ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO:25) для улучшения образования тройных спиралей, которые присутствуют в нативном белке МСЛ (как также описано в Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

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

MASP-2-ингибирующие пептиды также могут быть получены из участка расщепления С4, такого как "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO:29), который представляет собой участок расщепления С4, связанный с С-концевой частью антитромбина III (Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

ТАБЛИЦА 3: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ MASP-2 ИНГИБИРУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ

SEQ ID NO	**Источник**
SEQ ID NO:6	Белок MASP-2 человека
SEQ ID NO:8	Домен CUBI MASP-2 (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домены CUBIEGF MASP-2 (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домены CUBIEGFCUBII MASP-2 (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Домен EGF MASP-2 (ак 122-166)
SEQ ID NO:12	домен сериновой протеазы MASP-2 (ак 429-671)
SEQ ID NO:16	МСЛ-связывающая область в MASP-2
SEQ ID NO:3	MAp19 человека

SEQ ID NO	**Источник**
SEQ ID NO:21	Белок МСЛ человека
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, где "O"= гидроксипролин, а "X" является гидрофобным аминокислотным остатком	Синтетический пептид консенсусного связывающего участка из МСЛ человека и фиколинов человека
SEQ ID NO:23 OGKLG	Ценральный связывающий участок МСЛ человека
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Триплеты МСБ Человека 6-10- продемонстрировали связывание с MASP-2
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKL GPOGGPOGPO	Триплеты МСБ человека с GPO, добавленными для улучшения образования тройных спиралей
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQ GLRGLQGPOGKLGPOGN OGPSGSOGPKGQKGDOG KS	Триплеты 1-17 МСБ человека
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGP OGPOGKMGPKGEOGDO	H-фиколин человека (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGT NGKRGERGPOGPOGKAG POGPNGAOGEO	L-фиколин P35 человека
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRP FLVFI	Сайт расщепления C4 человека
SEQ ID NO:72 LEVTCEPGTTFKDKCNTC RCGSDGKSAVCTKLWCN Q	SGMI-2L (полноразмерный)
SEQ ID NO:73 TCEPGTTFKDKCNTCRCG SDGKSAVCTKLWCNQ	SGMI-2M (средняя усеченная версия)
SEQ ID NO:74 TCRCGSDGKSAVCTKLW CNQ	SGMI-2S (короткая усеченная версия)
Примечание: Буква "O" обозначает гидроксипролин. Буква "X" представляет собой гидрофобный остаток.	

Пептиды, полученные из сайта расщепления C4, а также другие пептиды, которые ингибируют центр сериновой протеазы MASP-2, могут быть химически модифицированы так, чтобы они становились необратимыми ингибиторами протеазы. Например, соответствующие модификации могут включать, в качестве неограничивающих примеров, галометилкетоны (Br, Cl, I, F) на C-конце, Asp или Glu, или присоединенные к функциональным боковым цепям; галогенацетильные (или другие α-галогенацетильные)

группы на аминогруппах или других функциональных боковых цепях; эпоксидные или имин-содержащие группы на N- или C-конце или на функциональных боковых цепях; или имидатные эфиры на N- или C-конце или на функциональных боковых цепях. Такие модификации могут давать преимущество постоянного ингибирования фермента в результате ковалентного присоединения пептида. Это может привести к снижению эффективных доз и/или потребности в менее частом введении пептидного ингибитора.

Кроме ингибирующих пептидов, описанных выше, MASP-2-ингибирующие пептиды, применимые в способе согласно изобретению, включают пептиды, содержащие MASP-2-связывающую CDRH3-область мАт против MASP-2, полученного, как описано в настоящем документе. Последовательность CDR-областей для применения в синтезе пептидов может быть определена способами, известными в данной области. Вариабельная область тяжелой цепи представляет собой пептид, который обычно имеет длину от 100 до 150 аминокислот. Вариабельная область легкой цепи представляет собой пептид, который обычно имеет длину от 80 до 130 аминокислот. CDR-последовательности в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи включают последовательности длиной только приблизительно 3-25 аминокислот, которые может легко секвенировать средний специалист в данной области.

Специалистам в данной области будет понятно, что по существу гомологичные вариации MASP-2-ингибирующих пептидов, описанных выше, также будут демонстрировать MASP-2-ингибирующую активность. Иллюстративные варианты включают, в качестве неограничивающих примеров, пептиды, имеющие вставки, делеции, замены и/или дополнительные аминокислоты на C-концевых или N-концевых участках рассматриваемых пептидов и их смесей. Таким образом, гомологичные пептиды, которые обладают MASP-2-ингибирующей активностью, считаются полезными в способах данного изобретения. Описанные пептиды также могут включать дублирующие мотивы и другие модификации с консервативными заменами. Консервативные варианты описаны в других частях настоящего документа и включают замену аминокислоты другой аминокислотой с таким же зарядом, размером или гидрофобностью и т.п.

MASP-2 ингибирующие пептиды могут быть модифицированы с целью увеличения растворимости и/или для максимального увеличения положительного или отрицательного заряда, чтобы обеспечить большее сходство с сегментом в интактном белке. Производное может иметь или не иметь точную первичную аминокислотную структуру пептида, раскрытого в настоящем документе, при условии, что производное функционально сохраняет нужное свойство ингибирования MASP-2. Модификации могут включать аминокислотную замену одной из широко известных двадцати аминокислот или другой аминокислотой, дериватизированной или замещенной аминокислотой со вспомогательными требуемыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментативному расщеплению, или D-аминокислотой, или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, который воспроизводит природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; аминокислотную делецию;

аминокислотную вставку с одной из общеизвестных двадцати аминокислот или другой аминокислотой, дериватизированной или замещенной аминокислотой со вспомогательными требуемыми характеристиками, такими как устойчивость к ферментативному расщеплению, или D-аминокислотой, или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, который воспроизводит природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод и мономер нуклеиновой кислоты, который воспроизводит природную конформацию, распределение зарядов и функцию исходного пептида. Пептиды также могут быть модифицированы путем ацетилирования или амидирования.

Синтез производных ингибирующих пептидов может быть основан на известных способах биосинтеза пептидов, биосинтеза углеводов и т.п. В качестве отправного пункта специалист может опираться на подходящую компьютерную программу для определения конформации представляющего интерес пептида. После того как конформация пептида, раскрытого в настоящем документе, станет известной, специалист методом рационального дизайна может определить, какой вид замен может быть сделан в одном или больше участках, чтобы смоделировать производное, которое сохраняет основную конформацию и распределение зарядов исходного пептида, но которое может обладать характеристиками, которые не присутствуют или улучшены по сравнению с характеристиками, которые имеет исходный пептид. После идентификации кандидатных молекул-производных, производные можно протестировать для определения, функционируют ли они в качестве MASP-2-ингибирующих средств, при использовании анализов, описанных в настоящем документе.

СКРИНИНГ MASP-2-ИНГИБИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Для создания и скрининга пептидов, которые имитируют молекулярные структуры ключевых областей связывания MASP-2 и ингибируют активности комплемента MASP-2, также можно использовать молекулярное моделирование и рациональный молекулярный дизайн. Молекулярные структуры, используемые для моделирования, включают CDR-области моноклональных антител против MASP-2, а также области-мишени, которые, как известно, важны для функции MASP-2, в том числе область, требуемую для димеризации, область, участвующую в связывании с МСЛ, и активный центр сериновой протеазы, как описано ранее. Способы идентификации пептидов, которые связываются со специфической мишенью, хорошо известны в данной области. Например, молекулярный импринтинг может использоваться для конструирования de novo макромолекулярных структур, таких как пептиды, которые связываются с конкретной молекулой. См., например, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sties", TRIP 2(5) 1994.

В качестве иллюстративного примера, один способ получения миметиков MASP-2-связывающих пептидов является следующим. Полимеризуют функциональные мономеры известного MASP-2-связывающего пептида или области связывания антитела против MASP-2, которое демонстрирует ингибирование MASP-2 (матрицу). Затем матрицу

удаляют, после чего следует полимеризация второго класса мономеров в пробел, оставшийся от матрицы, с получением новой молекулы, которая демонстрирует одно или больше требуемых свойств, которые подобны свойствам матрицы. В дополнение к получению пептидов таким способом, можно также получать другие MASP-2-связывающие молекулы, которые представляют собой MASP-2-ингибирующие средства, такие как полисахариды, нуклеозиды, лекарственные соединения, нуклеопротеины, липопротеины, углеводы, гликопротеины, стероид, липиды и другие биологически активные материалы. Этот способ полезен для создания широкого спектра биологических миметиков, которые более стабильны, чем их природные аналоги, поскольку они, как правило, получены путем свободнорадикальной полимеризации функциональных мономеров, в результате которой образуется соединение, скелет которого не поддается биохимическому разложению.

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

MASP-2-ингибирующие пептиды можно получать при использовании способов, известных в данной области, таких как метод твердофазного синтеза, первоначально описанный Меррифилдом в J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963. Автоматизированный синтез можно проводить, например, при использовании синтезатора пептидов Applied Biosystems 431A (Foster City, Calif.) в соответствии с инструкциями производителя. Другие способы можно найти, например, в Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, second edition, John Wiley & Sons, 1976, а также в других справочных изданиях, известных специалистам в данной области.

Пептиды могут быть получены с использованием стандартных методов генной инженерии, известных специалистам в данной области. Например, пептид может быть получен ферментативно в результате встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в вектор экспрессии, экспрессирующий ДНК, и трансляции ДНК в пептид в присутствии требуемых аминокислот. Затем пептид очищают с помощью хроматографических или электрофоретических методов, или посредством белка-носителя, который может быть слит с пептидом, а затем отщеплен от него, путем встраивания в вектор экспрессии в рамке считывания с кодирующей пептид последовательностью нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-носитель. Слитый белок-пептид может быть выделен с помощью хроматографических, электрофоретических или иммунологических методов (таких как связывание на смоле посредством антитела с белком-носителем). Пептид может быть отщеплен при использовании химической методики или ферментативно, как, например, при использовании гидролаз.

MASP-2-ингибирующие пептиды, которые могут применяться в способе согласно изобретению, можно получать в рекомбинантных клетках-хозяевах согласно стандартным методикам. Для экспрессии последовательности, кодирующей MASP-2-ингибирующий пептид, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, должна быть функционально связана с регуляторными последовательностями, которые контролируют транскрипционную экспрессию, в векторе экспрессии, и затем введена в клетку-хозяина.

В дополнение к транскрипционным регуляторным последовательностям, таким как промоторы и энхансеры, векторы экспрессии могут включать транскрипционные регуляторные последовательности и маркерный ген, которые подходят для селекции клеток, которые несут вектор экспрессии.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют MASP-2 ингибирующий пептид, могут быть синтезированы с помощью "генных машин" при использовании таких методик, как фосфорамидитный метод. Если химически синтезированная двуцепочечная ДНК требуется для такого применения, как синтез гена или фрагмента гена, то тогда каждую комплементарную цепь получают отдельно. Получение коротких генов (от 60 до 80 пар оснований) технически простое, и при этом может быть выполнено путем синтеза комплементарных цепей с их последующим отжигом. Для получения более длинных генов, синтетические гены (двухцепочечные) собирают в модульной форме из одноцепочечных фрагментов, которые имеют длину от 20 до 100 нуклеотидов. В качестве обзоров по полинуклеотидному синтезу, см., например, Glick and Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; и Climie, S., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 57:633, 1990.

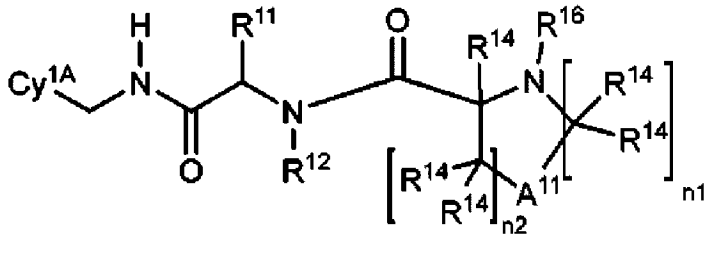
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНГИБИТОРЫ MASP-2

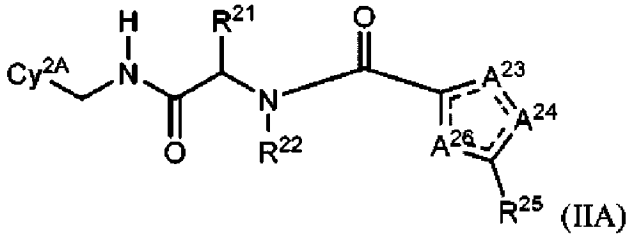
В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующие средства представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, в том числе природные и синтетические вещества, которые имеют низкую молекулярную массу (например, 50-1000 Да), такие как, например, пептиды, пептидомиметики и непептидные ингибиторы (например, олигонуклеотиды и органические соединения). Низкомолекулярные ингибиторы MASP-2 могут быть созданы на основе молекулярной структуры вариабельных областей антител против MASP-2.

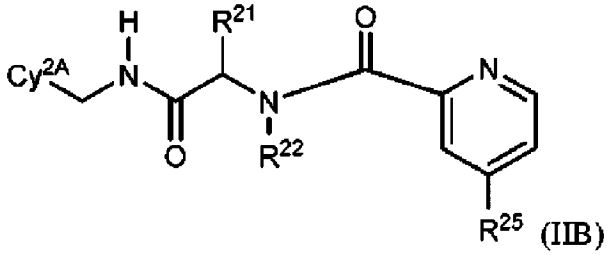
Низкомолекулярные ингибиторы также можно конструировать и создавать на основе кристаллической структуры MASP-2 при использовании компьютерного дизайна лекарственных средств (Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992). Была описана кристаллическая структура MASP-2 крысы (Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). При использовании метода, описанного Kuntz et al., координаты кристаллической структуры MASP-2 используются в качестве входных данных для компьютерной программы, такой как DOCK, которая выводит список низкомолекулярных структур, которые предположительно будут связываться с MASP-2. Применение таких компьютерных программ хорошо известно специалистам в данной области. Например, кристаллическая структура ингибитора протеазы ВИЧ-1 была использована для идентификации уникальных непептидных лигандов, которые представляют собой ингибиторы протеазы ВИЧ-1, при оценке соответствия соединений, которые содержатся в базе данных Cambridge Crystallographic, связывающему сайту фермента при использовании программы DOCK (Kuntz, I.D., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJariais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).

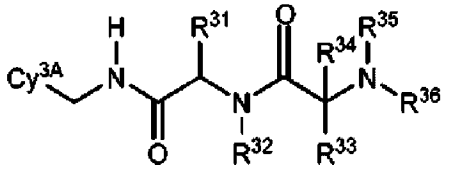
Примеры ингибиторов MASP-2 включают, без ограничения, соединения, раскрытые в заявках на патент США 62/943,629, 62/943,622, 62/943,611, 62/943,599, 16/425,791 и заявке PCT/US19/34220, каждая из которых настоящим включена посредством отсылок во всей своей полноте.

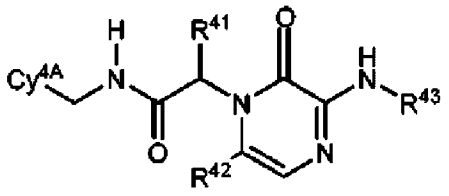
В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением Формулы (1-1), (IIA), (IIB), (III) или (IV):


(I-1)


(IIA)


(IIB)


(III)


(IV)

или его солью, где:

Cy^{1A} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил или незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила, образующего Cy^{1A}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где замещенный C_{6-10} арил или замещенный 5-10-членный гетероарил, образующий Cy^{1A}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{CylA}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, S^{Ra11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$,

$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

каждый R^{Cy1A} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy1A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, 3 или 4 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{Cy1A}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо, и где каждыq C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{Cy1A}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

R^{11} представляет собой H или C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил, образующий R^{11}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителя, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо, и где C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, образующий R^{11}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителя, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

R^{12} представляет собой H или C_{1-6} алкил; или

R^{11} и R^{12}, вместе с группами, к которым они присоединены, образуют 4-6-членное гетероциклоалкильное кольцо;

A^{11} представляет собой $CR^{13}R^{15}$ или N;

каждый R^{13} независимо представляет собой Cy^{1B}, $(CR^{13A}R^{13B})_{n3}Cy^{1B}$, ($C_{1-6}$ алкилен)Cy^{1B}, (C_{2-6} алкенилен)Cy^{1B}, (C_{2-6} алкинилен)Cy^{1B} или OCy^{1B}, где C_{1-6} алкиленовый, C_{2-6} алкениленовый или C_{2-6} алкиниленовый компонент в R^{13} незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$,

$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

каждый R^{14} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила;

R^{15} выбран из H, R^{13}, C_{1-6} алкила и OH;

пара групп R^{14}, присоединенная к соседним атомам углерода, или пара групп R^{14} и R^{15}, присоединенных к соседним атомам углерода, может, независимо от других случаев R^{14}, вместе быть заменена связью, соединяющей соседние атомы углерода, к которым присоединена пара групп R^{14} или пара групп R^{14} и R^{15}, при этом соседние атомы углерода соединяются двойной связью; или

пара групп R^{14}, присоединенная к одному и тому же атому углерода, или пара групп R^{13} и R^{15}, присоединенных к одному и тому же атому углерода, может, независимо от других случаев R^{14}, и вместе с атомом углерода, к которому присоединена пара групп R^{14} или пара групп R^{13} и R^{15}, вместе образовывать спироконденсированное C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо, где атомы в кольце образованного 4-10-членного гетероциклоалкильного кольца состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где образованное спироконденсированное C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо необязательно дополнительно замещено 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо; или

пары групп R^{14}, присоединенные к соседним атомам углерода, или пара групп R^{14} и R^{15}, присоединенная к соседним атомам углерода, может, независимо от других случаев R^{14}, вместе с соседними атомами углерода, к которым присоединена пара групп R^{14} или пара групп R^{14} и R^{15}, образовывать конденсированное C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо, где атомы в кольце образованного 4-10-членного гетероциклоалкильного кольца состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где образованное конденсированное C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо необязательно дополнительно замещено 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо; или

группа из четырех групп R^{14}, присоединенных к двум соседним атомам углерода, или группа из двух групп R^{14}, одной R^{13} и одной R^{15}, присоединенных к двум соседним атомам углерода, может, независимо от других случаев R^{14}, вместе с этими двумя соседними атомами углерода, к которым присоединена группа из четырех групп R^{14} или

группа из двух групп R^{14}, одной R^{13} и R^{15}, образовывать конденсированное C_{6-10} арильное или 5-10-членное гетероарильное, C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо, где атомы в образованном 5-10-членном гетероарильном кольце или 4-10-членном гетероциклоалкильном кольце состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S, и где образованное конденсированное C_{6-10} арильное или 5-10-членное гетероарильное, C_{3-10} циклоалкильное или 4-10-членное гетероциклоалкильное кольцо необязательно дополнительно замещено 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

n1 равно 1 или 2;

n2 равно 0, 1 или 2;

при условии, что сумма n1 и n2 равна 1, 2 или 3;

при условии, что в случае, если n1 равно 1, или n2 равно 0, то A^{11} представляет собой $CR^{13}R^{15}$;

n3 равно 0, 1 или 2;

каждый R^{13A} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил;

каждый R^{13B} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил; или

или R^{13A} и R^{13B}, присоединенные к одному и тому же атому углерода, независимо от любых других групп R^{13A} и R^{13B}, вместе могут образовывать $-(CH_2)_{2-5}-$, с образованием в результате 3-6-членного циклоалкильного кольца;

Cy^{1B} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{1B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и

где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий Cy^{1B}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy1B}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, S^{Ra11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOR)^{a11}NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

где каждый R^{Cy1B} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного

гетероциклоалкила, образующего R^{CylB}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy1B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{CylB}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

R^{16} представляет собой H, Cy^{1C}, C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, где C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{16}, незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из Cy^{1C}, галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо, при условии, что не больше чем один из заместителей R^{16} представляет собой Cy^{1C};

Cy^{1C} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{1C}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и

где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий Cy^{1C}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy1C}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, S^{Ra11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NOC(O)R)^{b11}NR^{c11}R^{d11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

где каждый R^{Cy1C} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy1C}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3

гетероатомов, выбранных из O, N и S; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{Cy1C}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{Cy1C}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a11}, SR^{a11}, $C(O)R^{b11}$, $C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $C(O)OR^{a11}$, $OC(O)R^{b11}$, $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)R^{b11}$, $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$, $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)R^{b11}$, $S(O)NR^{c11}R^{d11}$, $S(O)_2R^{b11}$, $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$, $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ и оксо;

каждый R^{a11}, R^{b11}, R^{c11} и R^{d11} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, C_{3-7} циклоалкила, 5-10-членного гетероарила, 4-10-членного гетероциклоалкила, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкила, 5-10-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-10-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{6-10} арил, C_{3-7} циклоалкил, 5-10-членный гетероарил, 4-10-членный гетероциклоалкил, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкил, 5-10-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-10-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a11}, R^{b11}, R^{c11} и R^{d11}, необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a12}, SR^{a12}, $C(O)R^{b12}$, $C(O)NR^{c12}R^{d12}$, $C(O)OR^{a12}$, $OC(O)R^{b12}$, $OC(O)NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(O)R^{b12}$, $NR^{c12}C(O)NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(O)OR^{a12}$, $C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$, $S(O)R^{b12}$, $S(O)NR^{c12}R^{d12}$, $S(O)_2R^{b12}$, $NR^{c12}S(O)_2R^{b12}$, $S(O)_2NR^{c12}R^{d12}$ и оксо;

или R^{c11} и R^{d11}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых необязательно замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a12}, SR^{a12}, $C(O)R^{b12}$, $C(O)NR^{c12}R^{d12}$, $C(O)OR^{a12}$, $OC(O)R^{b12}$, $OC(O)NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(O)R^{b12}$, $NR^{c12}C(O)NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(O)OR^{a12}$, $C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$, $NR^{c12}C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$, $S(O)R^{b12}$, $S(O)NR^{c12}R^{d12}$, $S(O)_2R^{b12}$, $NR^{c12}S(O)_2R^{b12}$, $S(O)_2NR^{c12}R^{d12}$ и оксо;

каждый R^{a12}, R^{b12}, R^{c12} и R^{d12} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил-C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{1-6} галогеналкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, фенил, C_{3-7} циклоалкил, 5-6-членный гетероарил, 4-7-членный гетероциклоалкил, фенил-C_{1-3} алкил, 5-6-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-7-членный

гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a12}, R^{b12}, R^{c12} и R^{d12}, необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкил)$_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

или R^{c12} и R^{d12}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых незамещена или замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкил)$_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

каждый R^{e11} и R^{e12} независимо предствляет собой H, CN или NO_2;

Cy^{2A} предствляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил или незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила, образующего Cy^{2A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где замещенный C_{6-10} арил или замещенный 5-10-членный гетероарил, образующие Cy^{2A}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy2A}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a21}, S^{Ra21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NOR^{a21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NOC(O)R^{b21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

каждый R^{Cy2A} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy2A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, 3 или 4 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy2A}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо, и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующие R^{Cy2A}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

R^{21} представляет собой H или C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил, образующий R^{21}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$,

$C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо, и где C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, образующий R^{21}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

R^{22} представляет собой H или C_{1-6} алкил; или

R^{21} и R^{22} вместе с группами, к которым они присоединены, образуют 4-6-членное гетероциклоалкильное кольцо;

A^{23} представляет собой N или NR^{23};

A^{24} представляет собой CR^{24}; N или NR^{24};

A^{26} представляет собой CR^{26} или S;

при условии, что

A^{23}, A^{24} и^{26} в Формуле (IIA) выбраны таким образом, что кольцо, включающее A^{23}, A^{24} и A^{26}, представляет собой гетероарильное кольцо, и символ $\overline{\overline{\overline{\quad}}}$ обозначает связь (нормализованную) ароматического кольца;

R^{23} представляет собой H или C_{1-6} алкил;

R^{24} представляет собой H; C_{1-6} алкил или фенил;

R^{25} представляет собой Cy^{2B}, $(CR^{25A}R^{25B})_{n25}Cy^{2B}$, ($C_{1-6}$ алкилен)Cy^{2B}, (C_{2-6} алкенилен)Cy^{2B} или (C_{2-6} алкинилен)Cy^{2B}, где C_{1-6} алкиленовый, C_{2-6} алкениленовый или C_{2-6} алкиниленовый компонент R^{25} незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

R^{26} представляет собой H или C_{1-6} алкил;

каждый R^{25A} представляет собой H или C_{1-6} алкил;

каждый R^{25B} представляет собой H или C_{1-6} алкил;

n25 равно 0, 1 или 2;

Cy^{2B} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{2B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и

где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-}

$_{10}$ циклоалкил или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил, образующие Cy^{2B}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy2B}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a21}, S^{Ra21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)R^{b21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NOR^{a21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NOC(O)R^{b21})NR^{c21}R^{d21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

где каждый R^{Cy2B} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy2B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy2B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{821}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)^{Rb21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующие R^{Cy2B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a21}, SR^{a21}, $C(O)R^{b21}$, $C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $C(O)OR^{a21}$, $OC(O)R^{b21}$, $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)^{Rb21}$, $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$, $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)R^{b21}$, $S(O)NR^{c21}R^{d21}$, $S(O)_2R^{b21}$, $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$, $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ и оксо;

каждый из которых независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, C_{3-7} циклоалкила, 5-10-членного гетероарила, 4-10-членного гетероциклоалкила, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкила, 5-10-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-10-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{6-10} арил, C_{3-7} циклоалкил, 5-10-членный гетероарил, 4-10-членный гетероциклоалкил, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкил, 5-10-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-10-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a21}, R^{b21}, R^{c21} и R^{d21}, необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a22}, SR^{a22}, $C(O)R^{b22}$, $C(O)NR^{c22}R^{d22}$, $C(O)OR^{a22}$, $OC(O)R^{b22}$, $OC(O)NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(O)R^{b22}$, $NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(O)OR^{a22}$, $C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$, $S(O)R^{b22}$, $S(O)NR^{c22}R^{d22}$, $S(O)_2R^{b22}$, $NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$, $S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$ и оксо;

или R^{c21} и R^{421}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых необязательно замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN,

OR^{a22}, SR^{322}, $C(O)R^{b22}$, $C(O)NR^{c22}R^{d22}$, $C(O)OR^{a22}$, $OC(O)R^{b22}$, $OC(O)NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(O)R^{b22}$, $NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(O)OR^{a22}$, $C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$, $NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$, $S(O)R^{b22}$, $S(O)NR^{c22}R^{d22}$, $S(O)_2R^{b22}$, $NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$, $S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$ и оксо;

каждый R^{a22}, R^{b22}, R^{c22} и R^{d22} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил-C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{1-6} галогеналкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, фенил, C_{3-7} циклоалкил, 5-6-членный гетероарил, 4-7-членный гетероциклоалкил, фенил-C_{1-3} алкил, 5-6-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-7-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a22}, R^{b22}, R^{c22} и R^{422}, необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкил)$_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

или R^{c22} и R^{d22}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых незамещена или замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкил)$_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

каждый R^{e21} и Re^{22} независимо представляет собой H, CN или NO_2;

Cy^{3A} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил или незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила, образующие Cy^{3A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где замещенный C_{6-10} арил или замещенный 5-10-членный гетероарил, образующие Cy^{3A}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy3A}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, S^{Ra31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

каждый R^{Cy3A} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy3A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, 3 или 4 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{Cy3A}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$,

$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо, и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{Cy3A} независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

R^{31} представляет собой H или C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил, образующий R^{31}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{831}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо, и где C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, образующий R^{31}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{831}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

R^{32} представляет собой H или C_{1-6} алкил; или

R^{31} и R^{32}, вместе с группами, к которым они присоединены, образуют 4-6-членное гетероциклоалкильное кольцо;

R^{33} представляет собой Cy^{3B}, $(CR^{33A}R^{33B})_{n33}Cy^{3B}$, ($C_{1-6}$ алкилен)Cy^{3B}, (C_{2-6} алкенилен)Cy^{3B} или (C_{2-6} алкинилен)Cy^{3B}, где C_{1-6} алкиленовый, C_{2-6} алкениленовый или C_{2-6} алкиниленовый компонент R^{35} незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

каждый R^{33A} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил;

каждый R^{33B} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил; или

или R^{33A} и R^{33B}, присоединенные к одному и тому же атому углерода, независимо от каких-либо других групп R^{33A} и R^{33B}, вместе могут образовывать $-(CH_2)_{2-5}-$, с получением в результате 3-6-членного циклоалкильного кольца;

n33 равно 0, 1, 2 или 3;

Cy^{3B} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где

атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{3B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и

где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил, образующие Cy^{3B}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy3B}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, S^{Ra31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOC(O)R^{b31})N\ R^{c31}R^{d31}$, $C(=NR^{e31})NR^{031}C(O)OR^{a31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

где каждый R^{Cy3B} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy3B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy3B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующие R^{Cy3B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

R^{34} выбран из H и C_{1-6} алкила;

R^{35} выбран из H, незамещенного или замещенного C_{1-6} алкила, и Cy^{3C}, где замещенный C_{1-6} алкил, образующий R^{35}, замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из Cy^{3C}, галогена, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо; при условии, что не больше одного из заместителей R^{35} являются Cy^{3C};

Cy^{3C} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила,

образующего Cy^{3C}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и

где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий Cy^{3C}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy3C}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, S^{Ra31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NOC(O)R^{b3})NR^{c31}R^{d31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

где каждый R^{Cy3C} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy3C}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{Cy3C}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{831}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{Cy3C}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a31}, SR^{a31}, $C(O)R^{b31}$, $C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $C(O)OR^{a31}$, $OC(O)R^{b31}$, $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)R^{b31}$, $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$, $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)R^{b31}$, $S(O)NR^{c31}R^{d31}$, $S(O)_2R^{b31}$, $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$, $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ и оксо;

R^{36} выбран из H и C_{1-6} алкила;

каждый R^{a31}, R^{b31}, R^{c31} и R^{d31} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, C_{3-7} циклоалкила, 5-10-членного гетероарила, 4-10-членного гетероциклоалкила, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкила, 5-10-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-10-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{6-10} арил, C_{3-7} циклоалкил, 5-10-членный гетероарил, 4-10-членный гетероциклоалкил, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкил, 5-10-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-10-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a31}, R^{b31}, R^{c31} и R^{d31}, необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a32}, SR^{a32}, $C(O)R^{b32}$, $C(O)NR^{c32}R^{d32}$, $C(O)OR^{a32}$, $OC(O)R^{b32}$, $OC(O)NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(O)R^{b32}$, $NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(O)OR^{a32}$, $C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$, $S(O)R^{b32}$, $S(O)NR^{c32}R^{d32}$, $S(O)_2R^{b32}$, $NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$, $S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$ и оксо;

или R^{c31} и R^{d31}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых необязательно замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a32}, SR^{a32}, $C(O)R^{b32}$, $C(O)NR^{c32}R^{d32}$, $C(O)OR^{a32}$, $OC(O)R^{b32}$, $OC(O)NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(O)R^{b32}$, $NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(O)OR^{a32}$, $C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$, $NR^{c32}C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$, $S(O)R^{b32}$, $S(O)NR^{c32}R^{d32}$, $S(O)_2R^{b32}$, $NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$, $S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$ и оксо;

каждый R^{a32}, R^{b32}, R^{c32} и R^{d32} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил-C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{1-6} галогеналкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, фенил, C_{3-7} циклоалкил, 5-6-членный гетероарил, 4-7-членный гетероциклоалкил, фенил-C_{1-3} алкил, 5-6-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-7-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a32}, R^{b32}, R^{c32} и R^{d32}, необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, $NH(C_{1-6}$ алкила), $N(C_{1-6}$ алкил$)_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

или R^{c32} и R^{d32}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых незамещена или замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, $NH(C_{1-6}$ алкила), N (C_{1-6} алкил$)_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо; и

каждый R^{e31} и Re^{32} независимо представляет собой H, CN или NO_2;

Cy^{4A} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил или незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарилп, образующего Cy^{4A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; где замещенный C_{6-10} арил или замещенный 5-10-членный гетероарил, образующие Cy^{4A}, замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy4A}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, S^{Ra41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOR)^{a41}NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

каждый R^{Cy4A} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующих R^{Cy4A}, состоят из атомов углерода и 1, 2, 3 или 4 гетероатомов, выбранных из

O, N и S, где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy4A}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NRC^{c41}(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо, и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий R^{Cy4A}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

R^{41} представляет собой H или C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил, образующий R^{41}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо, и где C_{6-10} арил-C_{1-6} алкил или 5-10-членный гетероарил-C_{1-6} алкил, образующий R^{41}, незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

R^{42} представляет собой H, C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил или Cy^{4B}; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{42}, незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из Cy^{4B}, галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо; при условии, что не больше чем один из заместителей представляет собой Cy^{4B};

Cy^{4B} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или незамещенного или замещенного 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{4B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий Cy^{4B}, замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо

выбран из R^{Cy4B}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, S^{Ra41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

где каждый R^{Cy4B} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего R^{Cy4B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S, и где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy4B}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо; и каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, каждый из которых образует R^{Cy4B}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

или R^{41} и R^{42}, вместе с атомами, к которым они присоединены, и атомом азота, связывающим атомы, к которым присоединены R^{41} и R^{42}, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо; которое необязательно дополнительно замещено 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy4B}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, S^{Ra41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

R^{43} представляет собой H, C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил или Cy^{4C}; где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующий R^{43}, незамещен или замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из: 0, 1, 2, 3, 4 или 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из Cy^{4C}, галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо, при условии, что не больше чем один заместитель из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила или C_{2-6} алкинила, образующих R^{43}, представляет собой Cy^{4C};

Cy^{4C} представляет собой незамещенный или замещенный C_{6-10} арил, незамещенный или замещенный 5-10-членный гетероарил, незамещенный или замещенный C_{3-10} циклоалкил или незамещенный или замещенный 4-10-членный гетероциклоалкил; где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или незамещенного или замещенного 4-10-членного гетероциклоалкила, образующего Cy^{4B}, состоят из атомов углерода и 1, 2 или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S; и где замещенный C_{6-10} арил, замещенный 5-10-членный гетероарил, замещенный C_{3-10} циклоалкил или 4-10-членный гетероциклоалкил, образующий Cy^{4C}, замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, каждый из которых независимо выбран из R^{Cy4C}, галогена, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, S^{Ra41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

каждый R^{Cy4C} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, 5-10-членного гетероарила, C_{3-10} циклоалкила и 4-10-членного гетероциклоалкила, где атомы в кольце 5-10-членного гетероарила или 4-10-членного гетероциклоалкила, образующих R^{Cy4C}, состоят из атомов углерода и 1, 2, или 3 гетероатомов, выбранных из O, N и S, где каждый C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или C_{2-6} алкинил, образующие R^{Cy4C}, независимо незамещены или замещены 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо; и где каждый C_{6-10} арил, 5-10-членный гетероарил, C_{3-10} циклоалкил и 4-10-членный гетероциклоалкил, каждый из которых образует R^{Cy4A}, независимо незамещен или замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41}, SR^{a41}, $C(O)R^{b41}$, $C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $C(O)OR^{a41}$, $OC(O)R^{b41}$, $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)R^{b41}$, $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$, $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)R^{b41}$, $S(O)NR^{c41}R^{d41}$, $S(O)_2R^{b41}$, $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$, $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ и оксо;

каждый R^{a41}, R^{b41}, R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{6-10} арила, C_{3-7} циклоалкила, 5-10-членного гетероарила, 4-10-членного гетероциклоалкила, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкила, 5-10-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-10-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{6-10} арил, C_{3-7} циклоалкил, 5-10-членный гетероарил, 4-10-членный гетероциклоалкил, C_{6-10} арил-C_{1-3} алкил, 5-10-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-10-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующие R^{a41}, R^{b41}, R^{c41} и R^{d41}, необязательно замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a42}, SR^{a42}, $C(O)R^{b42}$, $C(O)NR^{c42}R^{d42}$, $C(O)OR^{a42}$, $OC(O)R^{b42}$, $OC(O)NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(O)R^{b42}$, $NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(O)OR^{a42}$, $C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$,

$S(O)R^{b42}$, $S(O)NR^{c42}R^{d42}$, $S(O)_2R^{b42}$, $NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$, $S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$и оксо;

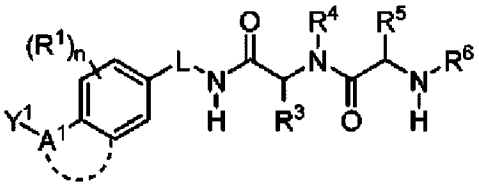
или R^{c41} и R^{d41}, присоединенный к тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых необязательно замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6} алкила, галогена, CN, OR^{a42}, SR^{a42}, $C(O)R^{b42}$, $C(O)NR^{c42}R^{d42}$, $C(O)OR^{a42}$, $OC(O)R^{b42}$, $OC(O)NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(O)R^{b42}$, $NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(O)OR^{a42}$, $C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$, $NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$, $S(O)R^{b42}$, $S(O)NR^{c42}R^{d42}$, $S(O)_2R^{b42}$, $NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$, $S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$и оксо;

каждый R^{a42}, R^{b42}, R^{c42} и R^{d42} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил-C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарил-C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкил-C_{1-3} алкила, где каждый указанный C_{1-6} алкил, C_{1-6} галогеналкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, фенил, C_{3-7} циклоалкил, 5-6-членный гетероарил, 4-7-членный гетероциклоалкил, фенил-C_{1-3} алкил, 5-6-членный гетероарил-C_{1-3} алкил, C_{3-7} циклоалкил-C_{1-3} алкил и 4-7-членный гетероциклоалкил-C_{1-3} алкил, образующий R^{a42}, R^{b42}, R^{c42} и R^{d42}, необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, $NH(C_{1-6}$ алкила), $N(C_{1-6}$ алкил$)_2$, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо;

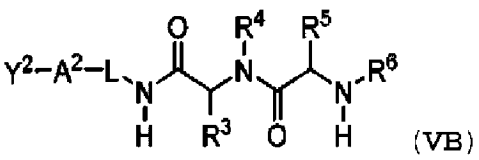
или R^{c42} и R^{d42}, присоединенные к одному и тому же атому N, вместе с атомом N, к которому они оба присоединены, образуют 4-, 5-, 6-или 7-членную гетероциклоалкильную группу или 5-членную гетероарильную группу, каждая из которых незамещена или замещена 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из OH, CN, амино, $NH(C_{1-6}$ алкила), $N(C_{1-6}$ алкил)2, галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} галогеналкила, C_{1-6} галогеналкокси и оксо; и

каждый R^{e41} и Re^{42} независимо представляет собой H, CN или NO_2.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением Формулы (**VA**) или (**VB**):



(VA),



(VB)

или его солью;

где:

A^1 является членом, выбранным из группы, состоящей из -(C=NH)-, -(C=NOR^a)-, -[C=NO(C=O)R^a]-, -[C=N[O(C=O)ZR^b]}-, конденсированного 5- или 6-членного

гетероциклила и конденсированного 5- или 6-членного гетероарила;

когда A^1 представляет собой -(C=NH)-, Y^1 выбран из группы, состоящей из $-NH_2$, $-NH(C=O)R^a$ и $-NH(C=O)ZR^b$;

когда A^1 представляет собой $-(C=NOR^a)-$, $-[C=NO(C=O)R^a]-$ или $-\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}-$, Y^1 представляет собой $-NH_2$;

когда A^1 представляет собой конденсированный гетероциклил или гетероарил, Y^1 представляет собой $-NH_2$ или галоген, и A^1 замещен m дополнительных групп R^1;

каждый R^a и R^b независимо выбран из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, C_3-C_{10} циклоалкила, C_6-C_{10} арила и C_7-C_{12} арилалкила; где R^a имеет m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, R^a и R^b соединены с образованием гетероциклильного кольца с m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси и галогена;

каждый Z независимо выбран из группы, состоящей из O и S;

A^2 является членом, выбранным из группы, состоящей из C_3-C_6 гетероарила, C_6 арила и C_2-C_6 алкила;

когда A^2 представляет собой C_3-C_6 гетероарил, Y^2 выбран из группы, состоящей из $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, хлора, $-(C=NH)NH_2$, $-(C=NH)NH(C=O)R^a$, $-(C=NH)NH(C=O)ZR^b$, $-(C=NOR^a)NH_2$, $-[C=NO(C=O)R^a]NH_2$ и $-\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}NH_2$; и A^2 замещен m дополнительных групп R^1;

когда A^2 представляет собой C_6 арил, Y^2 выбран из группы, состоящей из аминометила, гидрокси и галогена, и A^2 замещен m дополнительных групп R^1;

когда A^2 представляет собой C_2-C_6 алкил, Y^2 выбран из группы, состоящей из $-NH(C=NH)NH_2$, $-NH(C=NH)NH(C=O)R^a$ и $-NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$;

каждый R^1 представляет собой член, независимо выбранный из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси, амина, C_1-C_6 алкиламино и галогена;

каждое m и n является независимо выбранным целым числом от 0 до 3;

L представляет собой $-(O)_P-(C(R^{2a})(R^{2b}))_q-$,

каждый R^{2a} или R^{2b} представляет собой член, независимо выбранный из группы, состоящей из водорода и фтора;

p является целым числом от 0 до 1;

q является целым числом от 1 до 2;

R^3 является членом, выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1-C_6 алкила, C_1-C_6 фторалкила и карбокси(C_1-C_6 алкила); или, в альтернативе, R^3 и R^4 соединены с образованием азетидинового, пирролидинового или пиперидинового кольца;

R^4 является членом, выбранным из группы, состоящей из водорода и C_1-C_6 алкила; или, в альтернативе, R^4 и R^3 соединены с образованием азетидинового, пирролидинового или пиперидинового кольца;

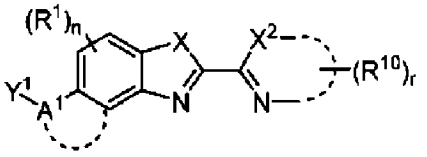
R^5 является членом, выбранным из группы, состоящей из C_3-C_7 циклоалкила, C_4-C_8 циклоалкилалкила, гетероарила и C_7-C_{12} арилалкила или гетероарилалкила, имеющего от

0 до 3 заместителей R^{13}; или, в альтернативе, R^5 и R^6 соединены с образованием гетероциклического кольца, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13};

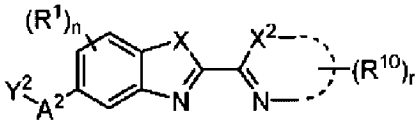
R^6 является членом, выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1-C_6 алкила, C_3-C_7 циклоалкила, карбокси(C_1-C_6 алкила), C_7-C_{12} арилалкила или гетероарилалкил, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13}, амино(C_1-C_8 алкила); и амидо(C_1-C_8 алкила); или, в альтернативе, R^6 и R^5 соединены с образованием гетероциклического кольца, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13}; и

каждый R^{13} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, C_6-C_{10} арила, (C_6-C_{10} арил)C_1-C_6 алкила, карбокси(C_1-C_6 алкилокси), гетероарила, (C_6-C_{10} гетероарил)C_1-C_6 алкила, гетероциклила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 амидо, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, две группы R^{13} соединены с образованием конденсированного C_6-C_{10} арильного, C_6-C_{10} гетероарильного или C_5-C_7 циклоалкильного кольца.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением Формулы (VIA) или (VIB):



(VIA)



(VIB)

или его солью; где:

A^1 является членом, выбранным из группы, состоящей из -(C=NH)-, -(C=NOR^a)-, -[C=NO(C=O)R^a]-, -[C=N[O(C=O)ZR^b]-, конденсированного 5- или 6-членного гетероциклила и конденсированного 5- или 6-членного гетероарила;

когда A^1 представляет собой -(C=NH)-, Y^1 выбран из группы, состоящей из -NH_2, -NH(C=O)R^a и -NH(C=O)ZR^b;

когда A^1 представляет собой -(C=NOR^a)-, -[C=NO(C=O)R^a]- или -{C=N[O(C=O)ZR^b]}-, Y^1 представляет собой -NH_2;

когда A^1 представляет собой конденсированный гетероциклил или гетероарил, Y^1 представляет собой -NH_2 или галоген, и A^1 замещен m дополнительных групп R^1;

каждый R^a и R^b независимо выбран из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, C_3-C_{10} циклоалкила, C_6-C_{10} арила и C_7-C_{12} арилалкила; где R^a имеет m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, R^a и R^b соединены с образованием гетероциклильного кольца с m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси и галогена;

каждый Z независимо выбран из группы, состоящей из O и S;

A^2 является членом, выбранным из группы, состоящей из C_3-C_6 гетероарила и C_2-C_6 алкила;

когда A^2 представляет собой C_3-C_6 гетероарил, Y^2 выбран из группы, состоящей из $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, хлора, $-(C=NH)NH_2$, $-(C=NH)NH(C=O)R^a$, $-(C=NH)NH(C=O)ZR^b$, $-(C=NOR^a)NH_2$, $-[C=NO(C=O)R^a]NH_2$ и $-\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}NH_2$; и A^2 замещен m дополнительных групп R^1;

когда A^2 представляет собой C_2-C_6 алкил, Y^2 выбран из группы, состоящей из $-NH(C=NH)NH_2$, $-NH(C=NH)NH(C=O)R^a$ и $-NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$;

каждый R^1 является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси, амина, C_1-C_6 алкиламино и галогена;

каждое m и n является независимо выбранным целым числом от 0 до 3;

каждый X и X^2 является членом, выбранным из группы, состоящей из NR^8, CH и CR^{10};

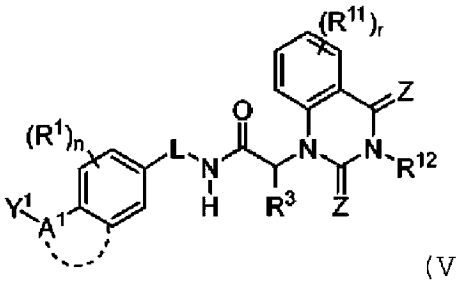
каждый R^8 является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из водорода и C_1-C_6 алкила;

каждый R^{10} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гетероарила или C_6-C_{10} арила, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13}, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, две группы R^{10} соединены с образованием конденсированного C_6 арильного, гетероарильного или C_5-C_7 циклоалкильного кольца, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13};

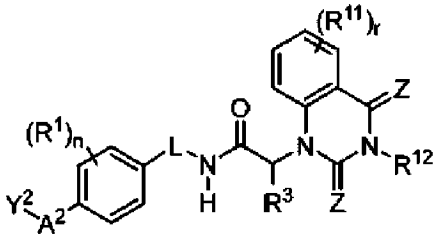
r является целым числом от 0 до 4; и

каждый R^{13} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, C_6-C_{10} арила, карбокси(C_1-C_6 алкилокси), гетероарила, гетероциклила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 амидо, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, две группы R^{13} соединены с образованием конденсированного C_6-C_{10} арильного, C_6-C_{10} гетероарильного или C_5-C_7 циклоалкильного кольца.

В некоторых конкретных вариантах осуществления малая молекула является соединением Формулы (VIIA), или (VIIB):



(VIIA),



(VIIB)

или его солью;

где:

A^1 является членом, выбранным из группы, состоящей из -(C=NH)-, -(C=NOR^a)-, -[C=NO(C=O)R^a]-, -[C=N[O(C=O)ZR^b]}-, конденсированного 5- или 6-членного гетероциклила и конденсированного 5-или 6-членного гетероарила;

когда A^1 представляет собой -(C=NH)-, Y^1 выбран из группы, состоящей из -NH_2, -NH(C=O)R^a и -NH(C=O)ZR^b;

когда A^1 представляет собой -(C=NOR^a)-, -[C=NO(C=O)R^a]- или -{C=N[O(C=O)ZR^b]}-, Y^1 представляет собой -NH_2;

когда A^1 представляет собой конденсированный гетероциклил или гетероарил, Y^1 представляет собой -NH_2 или галоген, и A^1 замещен m дополнительных групп R^1;

каждый R^a и R^b независимо выбран из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, C_3-C_{10} циклоалкила, C_6-C_{10} арила и C_7-C_{12} арилалкила; где R^a имеет m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкила, амино, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, R^a и R^b соединены с образованием гетероциклильного кольца с m заместителей, выбранных из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси и галогена;

каждый Z независимо выбран из группы, состоящей из O и S;

A^2 является членом, выбранным из группы, состоящей из C_3-C_6 гетероарила и C_2-C_6 алкила;

когда A^2 представляет собой C_3-C_6 гетероарил, Y^2 выбран из группы, состоящей из -NH_2, -CH_2NH_2, хлора, -(C=NH)NH_2, -(C=NH)NH(C=O)R^a, -(C=NH)NH(C=O)ZR^b, -(C=NOR^a)NH_2, -[C=NO(C=O)R^a]NH_2 и -{C=N[O(C=O)ZR^b]}NH_2; и A^2 замещен m дополнительных групп R^1;

когда A^2 представляет собой C_2-C_6 алкил, Y^2 выбран из группы, состоящей из -NH(C=NH)NH_2, -NH(C=NH)NH(C=O)R^a и -NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b; каждый R^1 является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси, амина, C_1-C_6 алкиламино и галогена;

каждый m и n является независимо выбранным целым числом от 0 до 3;

L представляет собой $-(O)_P-(C(R^{2a})(R^{2b}))_q-$

каждый R^{2a} или R^{2b} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из водорода и фтора;

p является целым числом от 0 до 1;

q является целым числом от 1 до 2;

R^3 является членом, выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1-C_6 алкила и карбокси(C_1-C_6 алкила);

каждый R^{11} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, C_1-C_6 алкокси, амина, C_1-C_6 алкиламино, галогена и $(R^{14})(R^{14})N(CO)-$; или, в альтернативе, две группы R^{11} соединены с образованием конденсированного C_6 арильного, гетероарильного или C_5-C_7 циклоалкильного кольца, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13};

r является целым числом от 0 до 4; и

каждый Z является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из O и NR^8;

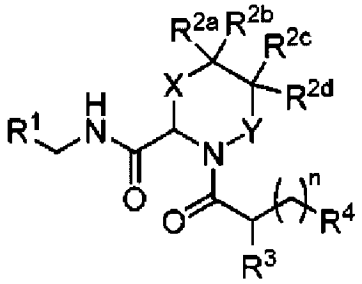
каждый R^8 является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из водорода и C_1-C_6 алкила;

каждый R^{12} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1-C_6 алкила и C_7-C_{14} арилалкила, имеющего от 0 до 3 заместителей R^{13};

каждый R^{13} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, гидроксила, гидроксил(C_1-C_6 алкила), C_1-C_6 алкокси, C_2-C_9 алкоксиалкил, амино, C_1-C_6 алкиламино и галогена; или, в альтернативе, две группы R^{13} соединены с образованием конденсированной C_6 арильного, гетероарильного или C_5-C_7 циклоалкильного кольца; и

каждый R^{14} является членом, независимо выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1-C_6 алкила, C_3-C_7 циклоалкила, C_4-C_8 циклоалкилалкила, C_7-C_{14} арилалкила и гетероарил(C_1-C_6 алкила); или, в альтернативе, две группы R^{13} соединены с образованием конденсированного гетероциклильного кольца.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или

незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, $C(=O)OR^5$, $OC(=O)R^5$, гидроксиалкила, алкокси, алкоксиалкила, галогеналкокси, циано, аминилалкила, карбоксиалкила, NR^5R^6, $C(=O)NR^5R^6$, $N(R^5)C(=O)R^6$, $NR^5C(=O)NR^6$, $S(O)_t$, SR^5, нитро, $N(R^5)C(O)OR^6$, $C(=NR^5)NR^6R^7$, $N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$, $S(O)R^5$, $S(O)NR^5R^6$, $S(O)_2R^5$, $N(R^5)S(O)_2R^6$, $S(O)_2NR^5R^6$, арила, гетероарила, гетероциклила, циклоалкила и оксо, при условии, что по меньшей мере при одном появлении R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j} не является водородом;

R^3 представляет собой $NR^{3a}R^{3b}$;

каждый R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, гетероциклил, гетероарил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил, циклоалкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^6$ или $(CH_2)_nP(=O)(OR^6)_2$;

или R^{3a} и R^{3b}, вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероарил или необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

или R^{3a} и R^4 вместе с азотом и углеродом, к которым они присоединены, соответственно, могут образовывать необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклил, когда n равно 2, 3, 4, 5 или 6; или

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный моноциклический гетероарил или замещенный или незамещенный гетероциклил, когда n равно 0 или 1;

R^5, R^6, R^7 и R^8 при каждом повлении независимо представляют собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, карбоксиалкил, гетероциклил, гетероарил или циклоалкил;

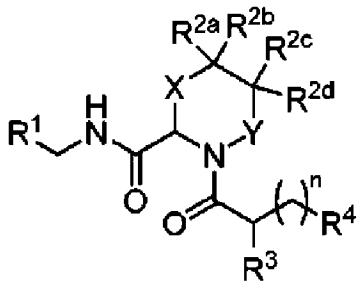
X представляет собой прямую связь, $-CR^{2e}R^{2f}-$ или $-CR^{2e}R^{2f}-CR^{2g}R^{2h}-$;

Y представляет собой прямую связь или $-CR^{2i}R^{2j}-$;

n является целым числом от 0-6; и

t равно 1-3.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:
R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, OR^5, $C(=O)OR^5$, $OC(=O)R^5$, гидроксиалкила, алкокси, алкоксиалкила, галогеналкокси, циано, аминилалкила, карбоксиалкила, NR^5R^6, $C(=O)NR^5R^6$, $N(R^5)C(=O)R^6$, $NR^5C(=O)NR^6$, $S(O)_t$, SR^5, нитро, $N(R^5)C(O)OR^6$, $C(=NR^5)NR^6R^7$, $N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$, $S(O)R^5$, $S(O)NR^5R^6$, $S(O)_{2R}{}^5$, $N(R^5)S(O)_2R^6$, $S(O)_2NR^5R^6$, арила, гетероарила, гетероциклила, циклоалкила и оксо, при условии, что по меньшей мере при одном появлении R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j} не является водородом;

R^3 представляет собой $NR^{3a}R^{3b}$;

каждый R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, $-CH_2C(C=O)OH$, $-CH_2C(=O)O$алкил, гетероциклил, гетероарил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил или циклоалкил;

или R^{3a} и R^{3b}, вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероарил или необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил, когда n равно 2, 3, 4, 5 или 6; или

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный моноциклический гетероарил или замещенный или незамещенный гетероциклил, когда n равно 0 или 1;

R^5, R^6, R^7 и R^8 при каждом появлении независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, карбоксиалкил, гетероциклил, гетероарил или циклоалкил;

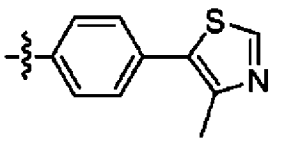
X представляет собой прямую связь, $-[C(R^{2e})R^{2f}]-$ или $-[C(R^{2e})R^{2f}]-[C(R^{2g})R^{2h}]-$;

Y представляет собой прямую связь или $-[C(R^{2i})R^{2j}]-$;

n является целым числом от 0-6; и

t равно 1-3,

при условии, что:

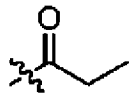
a) когда при одном появлении R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j} представляет собой OH, R^1 не имеет следующую структуру: 

;

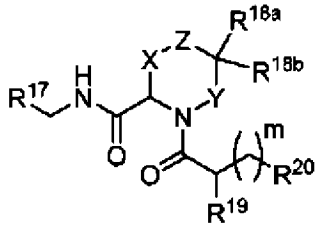
b) когда при одном появлении R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g} или R^{2h} представляет собой OH, n является целым числом от 2-6; и

c) когда при одном появлении R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f}, R^{2g}, R^{2h}, R^{2i} или R^{2j}

представляет собой незамещенный фенил, ни R^{3a}, ни R^{3b} не имеют следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^{17} представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{18a}, R^{18b}, R^{18c}, R^{18d}, R^{18e}, R^{18f}, R^{18g}, R^{18h}, R^{18i} или R^{18j} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, $-OR^{21}$, $C(=O)OR^{21}$, $OC(=O)R^{21}$, гидроксиалкила, алкокси, алкоксиалкила, галогеналкокси, циано, аминилалкила, карбоксиалкила, $NR^{21}R^{22}$, $C(=O)NR^{21}R^{22}$, $N(R^{21})C(=O)R^{22}$, $NR^{21}C(=O)NR^{22}$, $S(O)_t$, SR^{21}, нитро, $N(R^{21})C(O)OR^{22}$, $C(=NR^{21})NR^{22}R^{23}$, $N(R^{21})C(=NR^{22})NR^{23}R^{24}$, $S(O)R^{21}$, $S(O)NR^{21}R^{22}$, $S(O)_2R^{21}$, $N(R^{21})S(O)_2R^{22}$, $S(O)_2NR^{21}R^{22}$, арила, гетероарила, гетероциклила, циклоалкила и оксо, при условии, что по меньшей мере при одном появлении R^{18a}, R^{18b}, R^{18c}, R^{18d}, R^{18e}, R^{18f}, R^{18g}, R^{18h}, R^{18i} или R^{18j} не является водородом;

R представляет собой $NR^{19a}R^{19b}$;

каждый R^{19a} и R^{19b} независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, гетероциклил, гетероарил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил, циклоалкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^5$ или $(CH_2)_nP(=O)(OR^5)_2$; или R^{19a} и R^{19b} вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероарил или необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^{20} представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{21}, R^{22}, R^{23} и R^{24} при каждом появлении независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, карбоксиалкил, гетероциклил, гетероарил или циклоалкил;

X представляет собой прямую связь, $-CR^{2e}R^{2f}-$ или $-CR^{2e}R^{2f}-CR^{2g}R^{2h}-$;

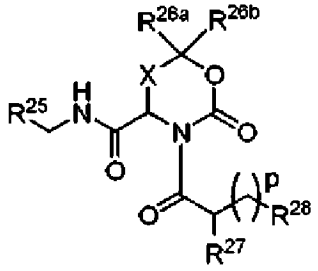
Y представляет собой прямую связь или $-CR^{2i}R^{2j}-$;

Z представляет собой O или S;

m является целым числом от 0-6; и

t равно 1-3.

В некоторых определенных вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^{25} представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{26a}, R^{26b}, R^{26c} или R^{26d} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, $-OR^{29}$, $C(=O)OR^{29}$, $OC(=O)R^{29}$, гидроксиалкила, алкокси, алкоксиалкила, галогеналкокси, циано, аминилалкила, карбоксиалкила, $NR^{29}R^{30}$, $C(=O)NR^{29}R^{30}$, $N(R^{29})C(=O)R^{30}$, $NR^{29}C(=O)NR^{30}$, $S(O)_t$, SR^{29}, нитро, $N(R^{29})C(O)OR^{30}$, $C(=NR^{29})NR^{30}R^{31}$, $N(R^{29})C(=NR)^{30}NR^{31}R^{32}$, $S(O)R^{29}$, $S(O)NR^{29}R^{30}$, $S(O)_2R^{30}$, $N(R^{29})S(O)_2R^{30}$, $S(O)_2NR^{29}R^{30}$, арила, гетероарила, гетероциклила, циклоалкила и оксо, при условии, что по меньшей мере при одном появлении R^{26a}, R^{26b}, R^{26c} или R^{26d} не является водородом;

R^{27} представляет собой $NR^{27a}R^{27b}$;

каждый R^{27a} и R^{27b} независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, гетероциклил, гетероарил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил, циклоалкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^{29}$ или $(CH_2)_nP(=O)(OR^{29})_2$;

или R^{27a} и R^{27b} вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероарил или необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^{28} представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

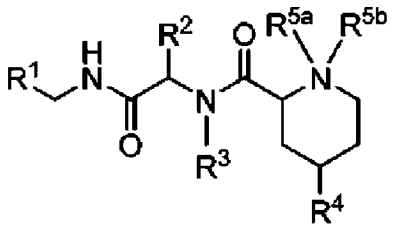
R^{29}, R^{30}, R^{31} и R^{32} при каждом появлении независимо представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил, галогеналкил, алкоксиалкил, карбоксиалкил, гетероциклил, гетероарил или циклоалкил;

X представляет собой прямую связь или $-CR^{26c}R^{26d}-$;

p является целым числом от 0-6; и

t равно 1-3.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^2 представляет собой водород, алкил, алкокси, галогеналкил, галогеналкокси или циклоалкил;

R^3 представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил; или R^2 и R^3 вместе с углеродом и азотом, к которым они присоединены соответственно, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{5a} представляет собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил, фосфоналкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^6$, $C(=O)R^6$, $C(=O)OR^6$ или $C(=O)NR^6R^7$;

R^{5b} представляет собой электронную пару или алкил;

R^6 и R^7 при каждом появлении независимо представляют собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил или арилалкил;

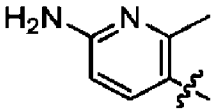
R^8 представляет собой алкил, галогеналкил, аминилалкил, замещенный или незамещенный арилалкил; и

n равно 1,2,3,4, 5, 6, 7 или 8,

при условии, что

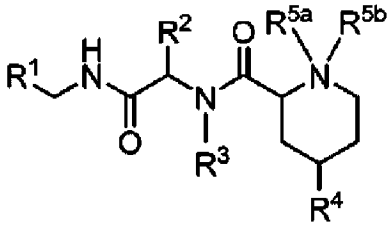
A) R^{5a} представляет собой алкил, галогеналкил, циклоалкил, фосфоналкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^6$, $C(=O)R^6$, $C(=O)OR^6$ или $C(=O)NR^6R^7$, или R^1 замещен одним или больше заместителями, выбранными из группы, состоящей из замещенного гетероарила, $C(=NH)NHC(=O)OR^8$, $C(=NOC(=O)R^8)NH_2$, $C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$ и $C(=NOH)NH_2$; и

B) когда R^{5a} представляет собой алкил или $(CH_2)_nC(=O)OR^6$, R^1 не имеет следующую структуру:



за исключением случаев, когда R^2 и R^3 вместе с углеродом и азотом, к которому они присоединены соответственно, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^2 представляет собой водород, алкил, алкокси, галогеналкил, галогеналкокси или циклоалкил;

R^3 представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил;

или R^2 и R^3 вместе с углеродом и азотом, к которым они присоединены соответственно, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{5a} представляет собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил, фосфоналкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^6$, $C(=O)R^6$, $C(=O)OR^6$ или $C(=O)NR^6R^7$;

R^{5b} представляет собой электронную пару или алкил;

R^6 и R^7 при каждом появлении независимо представляют собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил или арилалкил;

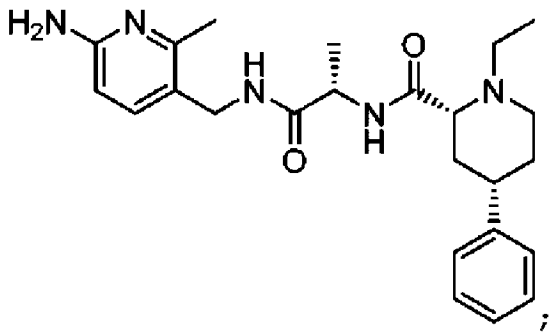
R^8 представляет собой алкил, галогеналкил, аминилалкил, замещенный или незамещенный арилалкил; и

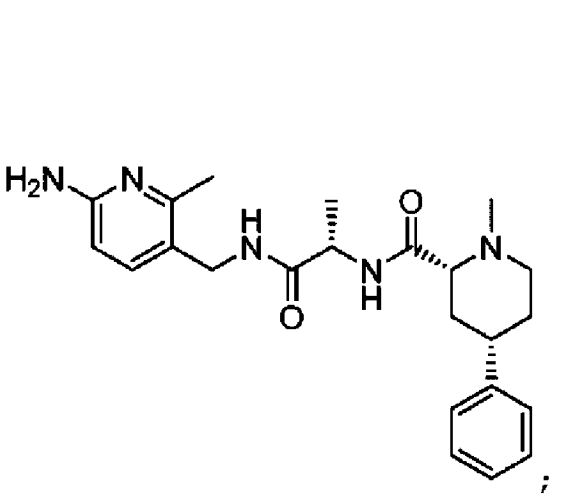
n равно 1,2,3,4, 5, 6, 7 или 8,

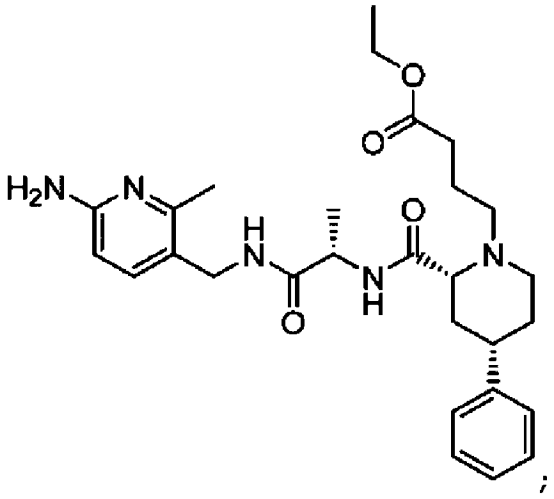
при условии, что

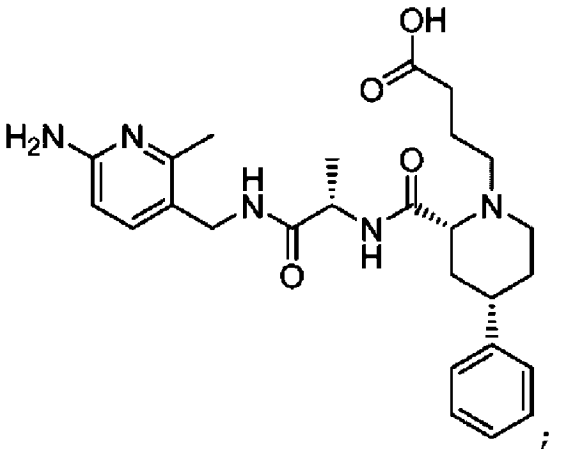
A) R^{5a} представляет собой алкил, галогеналкил, циклоалкил, фосфоналкил, $(CH_2)_nC(=O)OR^6$, $C(=O)R^6$, $C(=O)OR^6$ или $C(=O)NR^6R^7$, или R^1 замещен одним или больше заместителями, выбранными из группы, состоящей из замещенного гетероарила, $C(=NH)NHC(=O)OR^8$, $C(=NOC(=O)R^8)NH_2$, $C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$ и $C(=NOH)NH_2$; и

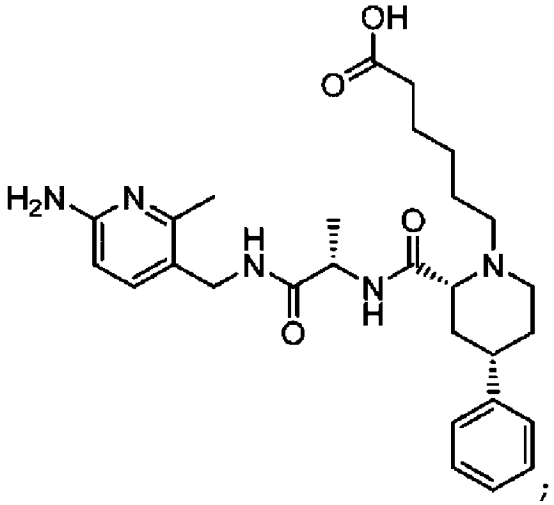
B) соединение Структуры (I) не имеет одну из следующих структур:

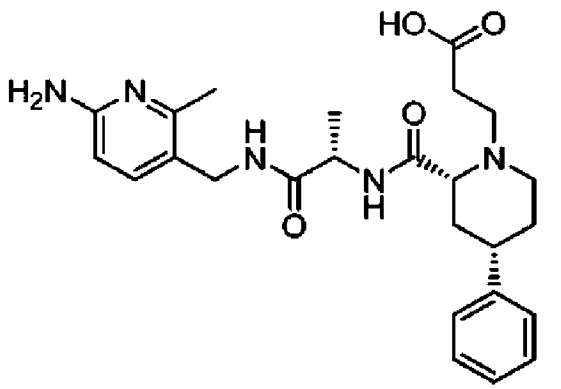



;

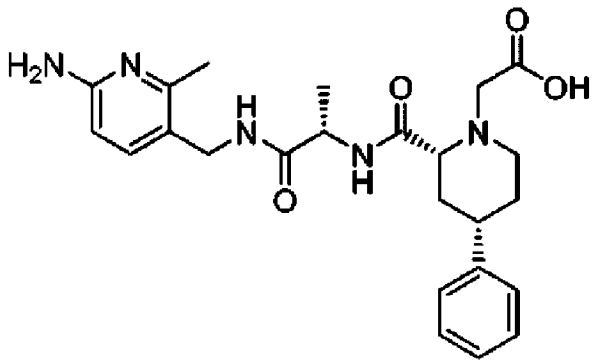

;


;


;

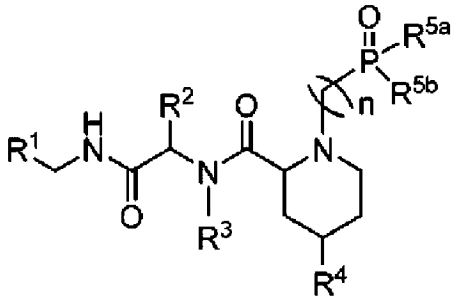


или


.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением,

имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

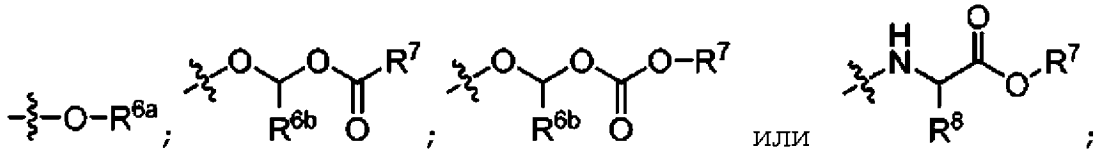
R^2 представляет собой водород, алкил, алкокси, галогеналкил, галогеналкокси или циклоалкил;

R^3 представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил;

или R^2 и R^3 вместе с углеродом и азотом, к которому они присоединены соответственно, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^{5a} и R^{5b} при каждом появлении независимо имеют одну из следующих структур:



или R^{5a} и R^{5b} вместе с атомом фосфора, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^{6a} представляет собой алкил, галогеналкил, арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклил;

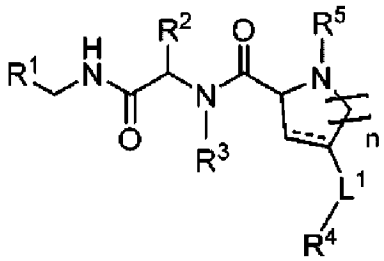
R^{6b} при каждом появлении независимо представляет собой водород или алкил;

R^7 при каждом появлении независимо представляет собой алкил, галогеналкил, гетероарил, циклоалкил, гетероциклил, арилалкил, гетероарилалкил, циклоалкилалкил или гетероциклилалкил;

R^8 представляет собой боковую цепь аминокислоты; и

n равно 1,2,3,4, 5, 6, 7 или 8.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:
---- представляет собой двойную или одинарную связь;

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил;

R^2 представляет собой водород, алкил, алкокси, галогеналкил, гидроксиалкил, галогеналкокси или циклоалкил;

R^3 представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил, или R^2 и R^3 вместе с углеродом и азотом, к которым они присоединены соответственно, образуют необязательно замещенный 4-7-членный гетероциклил;

R^4 представляет собой замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил или замещенный или незамещенный гетероциклил;

R^5 представляет собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил, фосфоналкил, $(CH_2)_mC(=O)OR^6$, $C(=O)R^6$, $C(=O)OR^6$, $(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$ или $C(=O)NR^6R^7$;

R^6 и R^7 при каждом появлении независимо представляют собой водород, алкил, галогеналкил, циклоалкил или арилалкил;

L^1 представляет собой прямую связь, $-CR^{8a}R^{8b}-$, $-S(O)_t-NR^{8c}$ или -O-;

каждый R^{8a} и R^{8b} независимо представляет собой водород, алкил, или R^{8a} и R^{8b} вместе с углеродом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 3-6-членный циклоалкил;

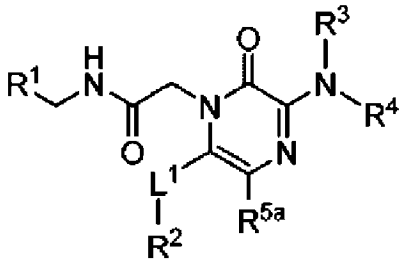
R^{8c} представляет собой водород, алкил, галогеналкил, (C=O)алкил, (C=O)Оалкил, (C=O)циклоалкил, (C=O)Оциклоалкил, (C=O)арил, (C=O)Оарил, (C=O)гетероарил, (C=O)Огетероарил, (C=O)гетероциклил, (C=O)О гетероциклил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклилалкил;

n равно 1 или 2;

m равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и

t равно О, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^1 представляет собой замещенный или незамещенный гетероарил;

R^2 представляет собой замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил;

R^3 представляет собой водород или алкил;

R^4 представляет собой алкил, замещенный или незамещенный арилалкил, гетероциклил, замещенный заместителями, выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного фенила или замещенного или незамещенного пиридинила, или R^3 и R^4 вместе с азотом и углеродом, к которым они присоединены соответственно, образует необязательно замещенный 4-10-членный гетероциклил;

R^{5a} представляет собой водород или галоген;

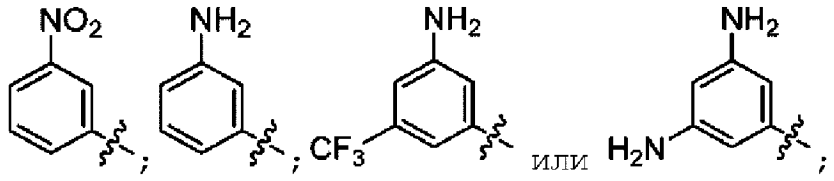
R^{5b} представляет собой водород, алкил, галогеналкил, (C=O)алкил, (C=O)Оалкил, (C=O)циклоалкил, (C=O)Оциклоалкил, (C=O)арил, (C=O)Оарил, (C=O)гетероарил, (C=O)Огетероарил, (C=O)гетероциклил, (C=O)Огетероциклил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил или замещенный или незамещенный гетероциклилалкил;

L^1 представляет собой прямую связь, $-CH_2-$, $-S(O)_t-NR^{5b}$, -O-, -C=C- или-C=C-; и

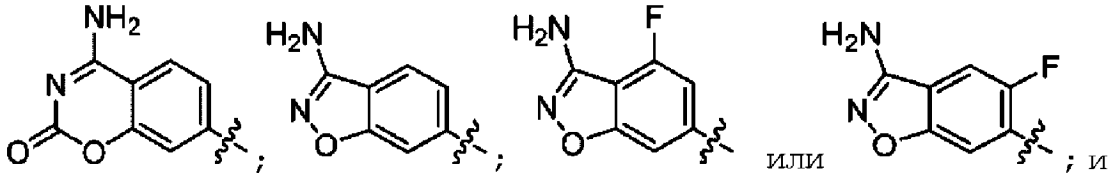
t равно 0, 1 или 2,

при условии, что:

A) R^2 не имеет одну из следующих структур:

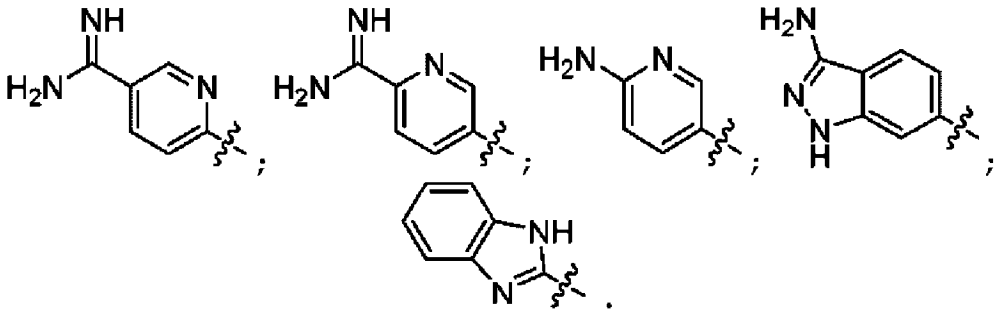


B) R^1 не имеет одну из следующих структур:

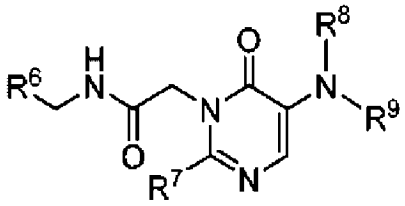


C) когда R^2 представляет собой незамещенный фенил, R^1 не имеет одну из

следующих структур:



В некоторых более конкретных вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^6 представляет собой замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил;

R^7 представляет собой алкил, $-SR^{10}$, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил;

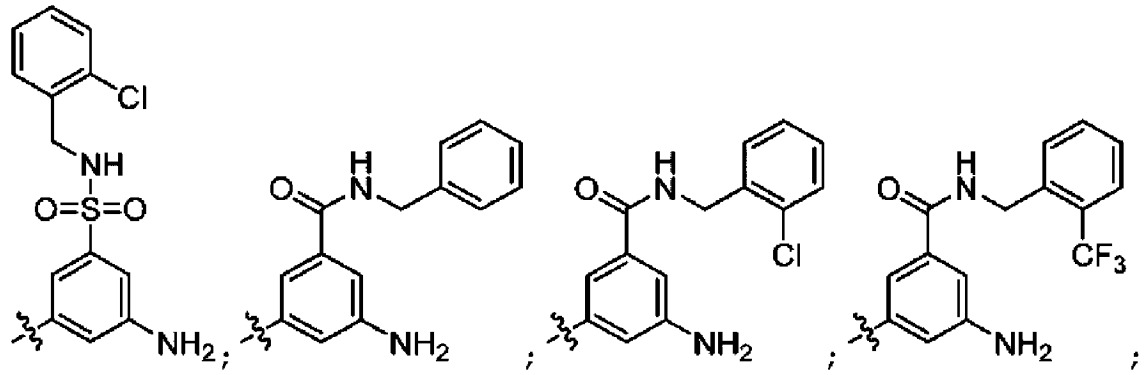
R^8 представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил;

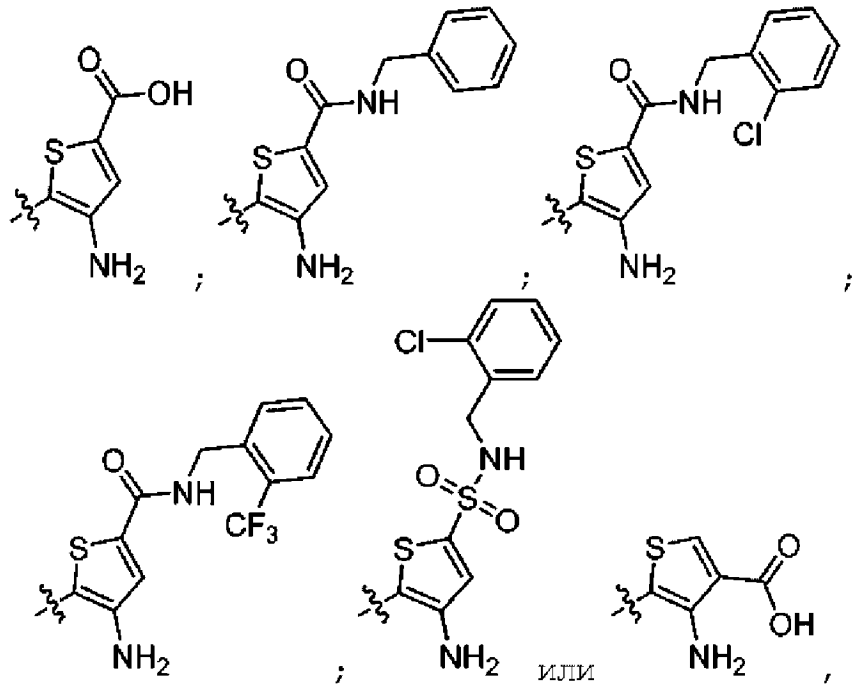
R^9 представляет собой замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, или R^8 и R^9 вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный 4-10-членный гетероциклил;

R^{10} представляет собой водород, алкил, галогеналкил или циклоалкил;

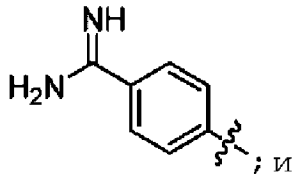
при условии, что:

A) когда R^7 представляет собой незамещенный фенил, 3-((метилсульфонил)амино)фенил, 2-метилфенил, 3-(диметиламино)фенил, 3-(метиламино)фенил, 3-метилфенил, 3-аминометилфенил, 3-аминофенил, незамещенный пиридинил, 3-(метиламино)-2-тиенил, 3,4-диамино-2-тиенил, 3-((метилсульфонил)амино)-2-тиенил, 3-амино-2-тиенил, 3-амино-5-5(аминокарбонил)фенил, или имеет одну из следующих структур:



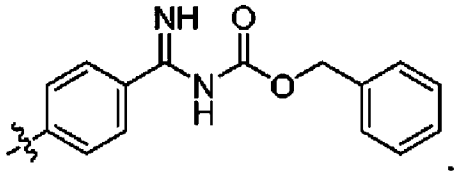


R^6 не имеет следующую структуру:



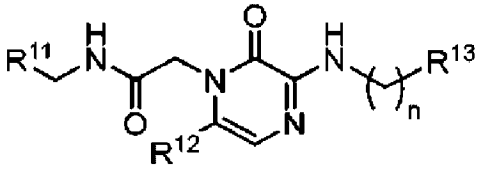
; и

B) когда R^7 представляет собой незамещенный фенил, R^6 не имеет следующую структуру:



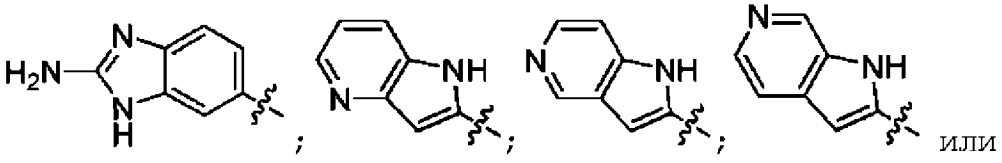
.

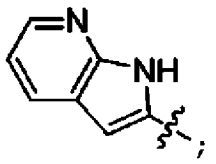
В некоторых вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^{11} имеет одну из следующих структур:



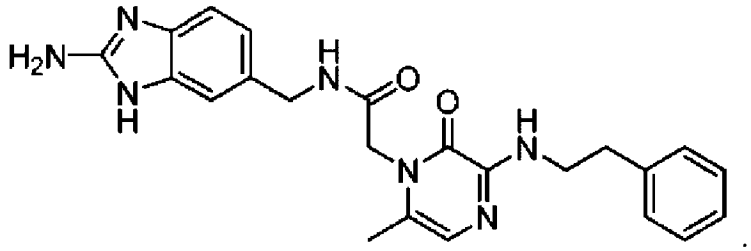


R^{12} представляет собой метил или галоген;

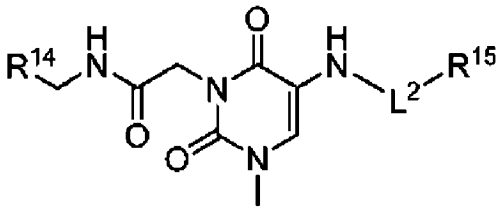
R^{13} представляет собой замещенный или незамещенный арил; и

n равно 1 или 2 при условии, что:

соединение Структуры (III) не имеет следующую структуру:



В некоторых более конкретных вариантах осуществления малая молекула является соединением, имеющим следующую Структуру:



или его стереоизомером, таутомером или фармацевтически приемлемой солью, где:

R^{14} представляет собой замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил; R^{15} представляет собой замещенный или незамещенный арилалкил или замещенный или незамещенный гетероарилалкил;

L^2 представляет собой прямую связь, -C(=O) или $-S(=O)_t-$; и

t равно 0, 1 или 2.

ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ MASP-2

В еще одном варианте осуществления данного аспекта изобретения MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором экспрессии MASP-2, способным ингибировать MASP-2-зависимую активацию комплемента. При практической реализации данного аспекта изобретения репрезентативные ингибиторы экспрессии включают антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот к MASP-2 (например, антисмысловые мРНК, антисмысловые ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды), рибозимы MASP-2 и MASP-2 РНКи молекулы.

Антисмысловые молекулы РНК и ДНК непосредственно блокируют трансляцию мРНК MASP-2 при гибридизации с мРНК MASP-2 и предотвращают трансляцию белка MASP-2. Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована различными способами при условии, что она может нарушать экспрессию MASP-2. Например, антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована

путем инвертирования кодирующей области (или ее части) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4) относительно ее нормальной ориентации для транскрипции, чтобы обеспечить транскрипцию ее комплементарной последовательности.

Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты, как правило, по существу идентична, по меньшей мере, части гена-мишени или генов-мишеней. Нуклеиновая кислота, тем не менее, не должна быть полностью идентична для ингибирования экспрессии. Как правило, более высокая гомология может использоваться для компенсации использования более короткой молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты. Минимальный процент идентичности, как правило, составляет больше чем приблизительно 65%, однако более высокий процент идентичности может обеспечивать более эффективную репрессию экспрессии эндогенной последовательности. Существенно больший процент идентичности больше чем приблизительно 80%, как правило, является предпочтительным, хотя идентичность от приблизительно 95% до полной идентичности, как правило, является наиболее предпочтительной.

Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты не должна обязательно иметь такой же профиль интронов или экзонов, что и ген-мишень, при этом некодирующие сегменты гена-мишени могут быть в равной степени эффективными для достижения антисмысловой супрессии экспрессии гена-мишени, как и кодирующие сегменты. Последовательность ДНК по меньшей мере из 8 нуклеотидов или около того может использоваться в качестве молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты, хотя более длинная последовательность является предпочтительной. В настоящем изобретении репрезентативный пример полезного MASP-2-ингибирующего средства представляет собой молекулу MASP-2-антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на девяносто процентов идентична комплементарной последовательности кДНК MASP-2, состоящей из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:4. Нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO:4, кодирует белок MASP-2, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:5.

Таргетинг антисмысловых олигонуклеотидов для связывания с мРНК MASP-2 является еще одним механизмом, который может использоваться для снижения уровня синтеза белка MASP-2. Например, синтез полигалактуроназы и мускаринового ацетилхолинового рецептора типа 2 ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на их соответствующие последовательности мРНК (патент США 5,739,119 за авторством Cheng и патент США 5,759,829 за авторством Shewmaker). Кроме того, примеры антисмыслового ингибирования были продемонстрированы с ядерным белком циклином, геном множественной лекарственной устойчивости (MDG1), ICAM-1, E-селектином, STK-1, стриарному ГАМКа-рецептору и EGF человека (см., например, патент США 5,801,154 за авторством Baracchini; патент США 5,789,573 за авторством Baker; патент США 5,718,709 за авторством Considine; и патент США 5,610,288 за авторством Reubenstein).

Была описана система, которая позволяет среднему специалисту определить, какие олигонуклеотиды могут применяться в изобретении, которая включает в себя поиск подходящих участков в мРНК-мишени при использовании расщепления РНКазой Н в качестве индикатора доступности последовательностей в транскриптах (Scherr, M., et al., Nucleic Acids Res. 25:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nucleic Acids Res. 29:3665-3673, 2001). Смесь антисмысловых олигонуклеотидов, которые комплементарны определенным областям транскриптов MASP-2, добавляют к экстрактам клеток, экспрессирующих MASP-2, таких как гепатоциты, и гибридизуют с целью создания сайта, чувствительного к воздействию РНКазы Н. Этот способ можно комбинировать с выбором последовательностей при помощи компьютера, что позволяет предсказывать выбор оптимальных последовательностей для антисмысловых композиций на основе их относительной способности образовывать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые могут снижать или блокировать специфическое связывание с мРНК-мишенью в клетке-хозяине. Анализ таких вторичных структур и оценки выбора сайта-мишени можно проводить при использовании программы для анализа праймеров OLIGO (Rychlik, I., 1997) и программ на основе алгоритма BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., Nucl Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Антисмысловые соединения, направленные на последовательность-мишень, предпочтительно имеют длину приблизительно от 8 до 50 нуклеотидов. Антисмысловые олигонуклеотиды, включающие приблизительно от 9 до 35 нуклеотидов или около того, являются особенно предпочтительными. Авторы изобретения рассматривают, что все олигонуклеотидные композиции в пределах от 9 до 35 нуклеотидов (т.е., длиной 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 оснований или около того) являются особенно предпочтительными для практической реализации способов на основе антисмысловых олигонуклеотидов согласно изобретению. Особенно предпочтительными областями-мишенями мРНК MASP-2 являются такие области, которые расположены на участке или около кодона инициации трансляции AUG, а также последовательности, которые по существу комплементарны 5'-областям мРНК, например, областям от -10 до +10 нуклеотидной последовательности гена MASP-2 (SEQ ID NO:4). Иллюстративные ингибиторы экспрессии MASP-2 представлены в ТАБЛИЦЕ 4.

ТАБЛИЦА 4: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ MASP-2

SEQ ID NO:30 (нуклеотиды 22-680 из SEQ ID NO:4)	Последовательность нуклеиновой кислоты кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4), кодирующий CUBIEGF
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3	Нуклеотиды 12-45 из SEQ ID NO:4, включающие участок начала трансляции MASP-2 (смысловой)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	Нуклеотиды 361-396 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, включающую МСЛ-связывающий участок MASP-2 (смысловой)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'	Нуклеотиды 610-642 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, включающую домен CUBII

Как отмечено выше, термин "олигонуклеотид" при использовании в настоящем документе относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметиков. Этот термин также распространяется на олигонуклеиновые основания, состоящие из природные нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (скелетных) связей, а также олигонуклеотиды с модификациями, не встречающимися в природе. Такие модификации позволяют вводить некоторые требуемые свойства, которые не доступны в случае природных олигонуклеотидов, такие как сниженные токсические свойства, повышенная устойчивость к расщеплению нуклеазами и повышенный захват клетками. В иллюстративных вариантах осуществления антисмысловые соединения согласно изобретению отличаются от нативной ДНК модификацией фосфодиэфирного скелета для увеличения периода существования антисмыслового олигонуклеотида, в котором фосфатные заместители заменяются фосфоротиоатными. Аналогичным образом, один или оба конца олигонуклеотида могут быть заменены одним или больше производныит акридина, которые встраиваются между соседними парами оснований в цепи нуклеиновой кислоты.

Другой альтернативой антисмысловым РНК является использование "РНК-интерференции" (РНКи). Двухцепочечная РНК (дцРНК) может вызывать сайленсинг генов у млекопитающих in vivo. Природной функцией РНКи и коссупрессии представляется защита генома от инвазии мобильных генетических элементов, таких как ретротранспозоны и вирусы, которые продуцируют аберрантные РНК или дцРНК в клетке-хозяине в результате своей активации (см., например, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 27:209-12, 1999). Двуцепочечная молекула РНК может быть получена путем синтеза двух цепей РНК, способных образовывать двуцепочечную молекулу РНК, каждая из которых имеет длину приблизительноно от 19 до 25 (например, 19-23 нуклеотидов). Например, молекула дцРНК, применимая в способах согласно изобретению, может включать РНК, соответствующую последовательности и ее комплементарной последовательности, указанным в ТАБЛИЦЕ 4. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна цепь РНК имела 3'-оверхенг из 1-5 нуклеотидов. Синтезированные цепи РНК объединяют при условиях, которые приводят к образованию двуцепочечной молекулы. Последовательность РНК может включать часть длиной по меньшей мере 8 нуклеотидов из SEQ ID NO:4 при общей длине 25 нуклеотидов или меньше. Дизайн последовательностей миРНК для конкретной мишени находится в рамках компетенции специалистов в данной области. Доступны коммерческие поставщики услуг, которые подбирают последовательности миРНК и гарантируют по меньшей мере 70% нокдаун экспрессии (Qiagen, Valencia, Calif).

ДцРНК можно вводить в качестве фармацевтической композиции и проводить известными способами, где нуклеиновую кислоту вводят в требуемую клетку-мишень. Широко используемые способы переноса генов включают методы на основе фосфата кальция, ДЭАЭ-декстрана, электропорации, микроинъекций и вирусов. Такие способы описаны в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.,

1993.

Рибозимы также могут использоваться для снижения количества и/или биологической активности MASP-2, например, рибозимы, которые направлены на мРНК MASP-2. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, которые могут расщеплять молекулы нуклеиновых кислот с последовательностями, которые полностью или частично гомологичны последовательности рибозима. Возможно конструировать рибозимные трансгены, которые кодируют РНК-рибозимы, которые специфично спариваются с РНК-мишенью и расщепляют фосфодиэфирный скелет в определенном участке, приводя к функциональной инактивации РНК-мишени. В процессе такого расщепления, рибозим сам по себе не изменяется, и, таким образом, способен к рециркуляции и расщеплению других молекул. Включение последовательностей рибозимов в антисмысловые РНК придает им РНК-расщепляющую активность, увеличивая активность антисмысловых конструкций.

Рибозимы, применимые при практической реализации изобретения, обычно включают область гибридизации по меньшей мере примерно из девяти нуклеотидов, которая комплементарна нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, части мРНК-мишени MASP-2, и каталитическую область, которая обеспечивает расщепление мРНК-мишени MASP-2 (см., в общем, EPA 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., Nature 534:585-591, 1988; Fedor, M.J., el al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986).

Рибозимы могут быть направлены непосредственно в клетки в виде РНК-олигонуклеотидов, включающих последовательности рибозимов, или введены в клетку в виде вектора экспрессии, кодирующего нужную рибозимную РНК. Рибозимы могут использоваться и применяться почти так же, как описано для антисмысловых полинуклеотидов.

Молекулы антисмысловых РНК и ДНК, рибозимов и РНКи, применимые в способах согласно изобретению, могут быть получены любым способом, известным в уровне техники для синтеза молекул ДНК и РНК. Они включают методы химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, хорошо известные в данной области, такие как, например, твердофазный фосфорамидитный химический синтез. В альтернативе молекулы РНК могут быть получены при транскрипции in vitro и in vivo последовательностей ДНК, кодирующих антисмысловые молекулы РНК. Такие последовательности ДНК могут быть встроены в различные векторы, которые включают подходящие РНК-полимеразные промоторы, такие как промоторы полимераз T7 или SP6. Кроме того, конструкции антисмысловых кДНК, которые синтезируют антисмысловую РНК конститутивно или индуцируемо, в зависимости от используемого промотора, можно стабильно вводить в клеточные линии.

Различные хорошо известные модификации молекул ДНК можно вводить для увеличения стабильности и полупериода существования. Полезные модификации включают, в качестве неограничивающих примеров, добавление фланкирующих

последовательностей рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов на 5'- и/или 3'-концы молекулы или использование фосфоротиоатных или 2' О-метильных, а не фосфодиэстеразных связей в олигодезоксирибонуклеотидном скелете.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ВВЕДЕНИЕ ДОЗ

В еще одном аспекте изобретения предложены композиции для ингибирования нежелательных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего заболеванием или патологическим состоянием, как указано в настоящем документе, включающие введение субъекту композиции, включающей терапевтически эффективное количество MASP-2-ингибирующего средства и фармацевтически приемлемый носитель. MASP-2-ингибирующие срежства могут вводить субъекту, нуждающемуся в этом, в терапевтически эффективных дозах для лечения или улучшения состояний, связанных с MASP-2-зависимой активацией комплемента. Терапевтически эффективная доза относится к количеству MASP-2-ингибирующего средства, достаточному для улучшения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

Токсичность и терапевтическая эффективность MASP-2 ингибирующих средств можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур с использованием экспериментальных моделей на животных, таких как модель на MASP-2 -/- мышах, экспрессирующих трансген MASP-2 человека, описанная в Примере 1. С помощью таких моделей на животных можно определять NOAEL (уровень наибольшей дозы без наблюдаемых нежелательных эффектов) и MED (минимально эффективную дозу) с использованием стандартных методов. Соотношение доз между NOAEL и MED представляет собой терапевтическое соотношение, которое выражается как отношение NOAEL/MED. MASP-2-ингибирующие средства, которые демонстрируют большие терапевтические отношения и индексы, являются наиболее предпочтительными. Данные, полученные в результате анализов культур клеток и в исследованиях на животных, могут использоваться при изготовлении составов различных дозировок для медицинского применения. Доза MASP-2-ингибирующего средства предпочтительно находится в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают MED с низкой или отсутствующей токсичностью. Доза может изменяться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемых путей введения.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическую эффективность MASP-2-ингибирующих средств для лечения, подавления, облегчения или предотвращения фиброза у субъекта-млекопитающего, страдающего или подвергающегося риску развития заболевания или нарушения, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, определяют на основе одного или больше из следующего: снижение одного из больше маркеров воспаления и рубцевания (например, TGFP-1, CTFF, IL-6, апоптоз, фибронектин, ламинин, коллагены, EMT, инфильтрирующие макрофаги) в ткани почек; снижение высвобождения растворимых маркеров воспаления и фиброза почек в мочу и плазму крови (например, при измерении выделительной функции почек).

Для любого состава соединений терапевтически эффективную дозу можно оценивать с использованием моделей на животных. Например, доза может быть включена в состав для введения в модели на животных с достижением диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает MED. Количественные уровни MASP-2-ингибирующего средства в плазме крови также могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к исследованиям токсичности, эффективная доза также может быть рассчитана по количеству белка MASP-2, присутствующего в организме живого субъекта, и аффинности связывания MASP-2-ингибирующего средства. Было показано, что уровни MASP-2, у здоровых людей присутствуют в сыворотке крови на низких уровнях примерно 500 нг/мл, и уровни MASP-2 у отдельного субъекта могут быть определены с помощью количественного анализа на MASP-2, описанного в публикации Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol Methods 282:159-167, 2003.

Как правило, доза вводимых композиций, включающих MASP-2-ингибирующие средства, варьирует в зависимости от таких факторов, как возраст субъекта, вес, рост, пол, общее состояние здоровья и сведения о перенесенных заболеваниях. В качестве иллюстрации, MASP-2-ингибирующие средства, такие как антитела против MASP-2, можно вводить в диапазонах доз приблизительно от 0,010 до 10,0 мг/кг, предпочтительно от 0,010 до 1,0 мг/кг, более предпочтительно от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает комбинацию антител против MASP-2 и MASP-2-ингибирующих пептидов.

Терапевтическую эффективность MASP-2-ингибирующих композиций и способов согласно настоящему изобретению у конкретного субъекта, а также соответствующие дозы, можно определить в соответствии с анализами комплемента, хорошо известными специалистам в данной области. Комплемент дает множество специфических продуктов. В течение последнего десятилетия были разработаны чувствительные и специфичные коммерческие тесты для большинства этих продуктов активации, включая малые фрагменты активации C3, C4a и C5a и большие фрагменты активации iC3b, C4d, Bb и sC5b-9. В большинстве этих способов используются моноклональные антитела, которые реагируют с новыми антигенами (неоантигенами), экспонированными на фрагменте, а не на нативных белках, из которых они образуются, что делает такие способы очень простыми и специфичными. Большинство из них основаны на технологии ИФА (иммуноферментного анализа), хотя радиоиммуноанализ иногда все еще используют для C3a и C5a. В этих последних тестах определяют как непроцессированные фрагменты, так и их 'desArg' фрагменты, которые являются основными формами, обнаруживаемыми в кровотоке. Непроцессированные фрагменты и $C5a_{desArg}$ быстро выводятся из-за связывания с рецепторами клеточной поверхности, и, следовательно, присутствуют в очень низких концентрациях, тогда как $C3a_{desArg}$ не связывается с клетками и накапливается в плазме крови. Измерение C3a обеспечивает чувствительный, независимый от конкретного пути, индикатор активации комплемента. Активацию

альтернативного пути можно оценивать при определении фрагмента Bb. Обнаружение в жидкой фазе продукта активации пути атаки мембраны, sC5b-9, служит подтверждением того, что комплемент активируется полностью. Поскольку и лектиновый, и классический пути дают одинаковые продукты активации, C4a и C4d, измерение этих двух фрагментов не дает никакой информации о том, по какому из этих двух путей образовались продукты активации.

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

В некоторых вариантах осуществления способы предотвращения, лечения, регрессии и/или подавления фиброза и/или воспаления включают введение MASP-2-ингибирующего средства (например, MASP-2-ингибирующего антитела), в качестве части терапевтической схемы, вместе с одним или больше другими лекарственными средствами, биопрепаратами или методами терапевтического вмешательства, подходящими для подавления фиброза и/или воспаления. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство, биопрепарат или терапевтическое вмешательство подходят для конкретных симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением. В качестве примера, MASP-2-ингибирующие антитела можно вводить в качестве части терапевтической схемы вместе с одним или больше иммунодепрессантами, такими как метотрексат, циклофосфамид, имуран и микофенолата мофетил. В качестве другого примера, MASP-2-ингибирующие антитела можно вводить в качестве части терапевтической схемы вместе с одним или больше средствами, улучшающими кровоток (например, нифедипином, амлодипином, дилтиаземом, фелодипином или никардипином). В качестве другого примера, MASP-2-ингибирующие антитела можно вводить в качестве части терапевтической схемы вместе с одним или больше средствами, предназначенными для уменьшения фиброза, такими как d-пеницилламин, колхицин, PUVA, Релаксин, циклоспорин, блокаторы TGF-бета и/или блокаторы p38 MAPK. В качестве другого примера, MASP-2-ингибирующие антитела можно вводить в качестве части терапевтической схемы вместе со стероидами или бронхолитиками.

Композиции и способы, включающие MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела), необязательно могут включать одного или больше дополнительных терапевтических средств, которые могут усиливать активность MASP-2-

ингибирующего средства или обеспечивают сходные терапевтические функции аддитивным или синергическим способом. Например, в контексте лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, вызванным или осложненным фиброзом и/или воспалением, одно или больше MASP-2-ингибирующих средств можно вводить в комбинации (включая совместное введение) с одним или больше дополнительными противофиброзными средствами и/или одним или больше противовирусными и/или противовоспалительными средствами и/или иммунодепрессантами.

MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела) могут применяться в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как обычные противовирусные средства или иммунодепрессанты, такие как кортикостероиды, иммунодепрессивные или цитотоксические средства, и/или противофиброзные средства.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела или низкомолекулярные ингибиторы MASP-2) применяются в качестве монотерапии для лечения субъекта, страдающего инфекцией, вызванной вирусом гриппа или коронавирусом. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела или низкомолекулярные ингибиторы MASP-2) применяются в комбинации с другими терапевтическими средства, такими как противовирусные средства, терапевтические антитела, кортикостероиды и/или другие средства, которые, как было показано, эффективны для лечения субъекта, страдающего инфекцией, вызванной вирусом гриппа или коронавирусом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующие антитела или низкомолекулярные ингибиторы MASP-2) и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, такое как противовирусное средство (например, ремдесивир), терапевтическое антитело к другой мишени кроме MASP-2, кортикостероид, антикоагулянт, такой как низкомолекулярный гепарин (например, эноксапарин) и антибиотик (например, азитромицин).

В таких комбинированных терапиях MASP-2-ингибирующее средство могут включать в составы или вводить одновременно, до или после одного или больше других требуемых терапевтических средств против COVID-19, таких как противовирусное средство (например, ремдесивир), терапевтическое антитело к другой мишени кроме MASP-2, кортикостероид или антикоагулянт. Каждый компонент комбинированной терапии может быть включен в составы различными способами, которые известны в уровне техники. Например, MASP-2-ингибирующее средство и второе средство комбинированной терапии могут включать в состав вместе или отдельно. MASP-2-ингибирующее средство и дополнительное средство могут соответственно вводить пациенту с COVID-19 одновременно или в ходе серии процедур.

Иллюстративные противовирусные средства включают, например дарунавир (который может применяться с ритонавиром или кобицистатом для повышения уровней

дарунавира), фавилавир, лопинавир, ритонавир, ремдесивир, галидесивир, эбастин, данопревир, ASC09, эмтрицитабин, тенофовир, умифновир, балоксавир марбоксил, азвудин и/или ISR-50. Иллюстративные терапевтические антитела включают, например, ингибиторы фактора роста сосудов (например, бевацизумаб), PD-1-блокирующие антитела (например, тимозин, камрелизумаб), антагонисты CCR5 (например, леронлимаб), антагонисты рецептора IL-6 (например, сарилумаб, тоцилизумаб), IL-6-направленные ингибиторы (например, силтуксимаб), антитела против ГМ-КСФ (например, гимсилумаб, TJM2), ГМ-КСФ рецептор-альфа-блокирующие антитела (например, маврилумумаб), антитела против C5 (например, экулизумаб, равулизумаб) и/или антитела против C5a (IFX-1).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, MASP-2-ингибирующие средства (например, MASP-2-ингибирующие антитела, например, OMS646 или низкомолекулярные ингибиторы MASP-2) применяются в комбинации с противовирусным средством, таким как ремдесивир, для лечения субъекта, страдающего COVID-19.

Другие средства, которые могут быть эффективными для лечения коронавируса и/или вируса гриппа, включают, например, хлорохин/гидроксихлорохин, камостат мезилат, руксолиниб, пэгинтерферон альфа-2b, новаферон, ифенпродил, рекомбинантный ACE2, APN01, брилацидин, BXT-25, BIO-11006, финголимод, WP1122, интерферон бета-1a, нафамостат, лозартан и/или алтеплаза.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НОСИТЕЛИ И НЕСУЩИЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ

Обычно композиции MASP-2-ингибирующего средства согласно изобретению, в комбинации с любыми другими выбранными терапевтическими средствами, соответственно содержатся в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель является нетоксичным, биосовместимым и выбирается так, чтобы не оказывать нежелательного воздействия на биологическую активность MASP-2-ингибирующего средства (и любых других терапевтических средств в комбинации с ним). Примеры фармацевтически приемлемых носителей для пептидов описаны в патенте США 5,211,657 за авторством Yamada. Антитела против MASP-2 и ингибиторные пептиды, применимые в изобретении, могут быть включены в состав препаратов в твердых, полутвердых, гелевых, жидких или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депозитории, составы для ингаляции и инъекций, допускающие пероральное, парентеральное или операционное введение. Изобретение также предусматривает местное введение композиций путем нанесения покрытий на медицинские приборы и т.п.

Подходящие носители для парентеральной доставки посредством инъекционной, инфузионной или ирригационной и наружной доставки включают дистиллированную воду, фосфатно-солевой буферный раствор, нормальный или лактированный растворы Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнкса или пропандиол. Кроме того, стерильные нелетучие масла могут использоваться в качестве растворителя или суспензионной среды. Для этой цели может использоваться любое биосовместимое масло, включая

синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при приготовлении растворов для инъекций. Носитель и средство можно смешивать в виде жидкости, суспензии, полимеризующегося или неполимеризующегося геля, пасты или мази.

Носитель может также включать несущую среду для доставки для пролонгации (т.е., продления, задержки или регулирования) доставки средства (средств) или для улучшения доставки, поглощения, стабильности или фармакокинетики терапевтического средства (средств). Такая несущая среда для доставки может включать, в качестве неограничивающих примеров, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие гидрогелевые и мицеллярные системы доставки включают сополимеры PEO:PHB:PEO и сополимер/циклодекстриновые комплексы, раскрытые в WO 2004/009664 A2, а также PEO и PEO/циклодекстриновые комплексы, раскрытые в публикации заявки на патент США 2002/0019369 A1. Такие гидрогели можно вводить локально в участок предполагаемого воздействия, или подкожно или внутримышечно, с формированием депо пролонгированного высвобождения.

В случае внутрисуставной доставки MASP-2-ингибирующее средство может содержаться в описанных выше жидких или гелевых носителях, пригодных для инъекций, описанных выше несущих средах для доставки с пролонгированным высвобождением, пригодных для инъекций, или в гиалуроновой кислоте или производном гиалуроновой кислоты.

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

В случае наружного применения MASP-2-ингибирующее средство может содержаться в мази, лосьоне, креме, геле, капле, суппозитории, спрее, жидкости или порошке, или в гелевых или микрокапсульных системах доставки посредством трансдермального пластыря.

Различные назальные и ингаляционные системы доставки, включая аэрозоли, дозирующие ингаляторы, порошковые ингаляторы и небулайзеры, разрабатываются и могут быть соответствующим образом приспособлены для доставки согласно настоящему изобретению в аэрозольной, ингаляционной или распыляемой несущей среде для доставки, соответственно.

В случае интратекальной (ИТ) или интрацереброventрикулярной (ИЦВ) доставки соответствующие стерильные системы доставки (например, жидкости; гели, суспензии и др.) могут использоваться для введения согласно настоящему изобретению.

Композиции согласно настоящему изобретению также могут включать биосовместимые вспомогательные вещества, такие как диспергирующие или смачивающие вещества, суспендирующие вещества, разбавители, буферы, усилители

проникновения, эмульгаторы, связующие вещества, загустители, ароматизаторы (в случае перорального введения).

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ АНТИТЕЛ И ПЕПТИДОВ

В частности, в отношении антител против MASP-2 и ингибиторных пептидов, иллюстративные составы можно вводить парентерально в виде инъекционных доз раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может быть стерильной жидкостью, такой как вода, масла, раствор хлорида натрия, глицерин или этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие вещества, поверхностно-активные вещества, pH-буферные вещества и т.п., могут присутствовать в композициях, включающих антитела против MASP-2 и ингибиторные пептиды. Дополнительные компоненты фармацевтических композиций включают масло (такое как, например, растительного, животного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. Как правило, гликоли, например, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями в случае растворов для инъекций.

Антитела против MASP-2 и ингибиторные пептиды также можно вводить в форме депо-инъекции или имплантируемого препарата, которые могут быть изготовлены таким образом, чтобы обеспечивать постоянное или пульсирующее высвобождение действующих веществ.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ИНГИБИТОРОВ ЭКСПРЕССИИ

В частности, в отношении ингибиторов экспрессии, применимых в способах согласно изобретению, предложены композиции, которые включают ингибитор экспрессии, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Композиция может дополнительно включать коллоидную дисперсную систему.

Фармацевтические композиции, которые включают ингибиторы экспрессии, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть созданы из различных компонентов, которые включают, без ограничения, предварительно подготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующие полутвердые вещества. Получение таких композиций, как правило, включает комбинирование ингибитора экспрессии с одним или более из следующего: буферы, антиоксиданты, низкомолекулярные полипептиды, белки, аминокислоты, углеводы, включая глюкозу, сахарозу или декстрины, хелатообразователи, такие как ЭДТА, глутатион, а также другие стабилизаторы и вспомогательные вещества. Примерами подходящих разбавителей являются нейтральный забуференный раствор хлорида натрия или раствор хлорида натрия, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть получены и

изготовлены в виде эмульсий, которые, как правило, представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в форме капель (см., Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Vol, 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, inc., N.Y., 1988). Примеры природных эмульгаторов, используемых в эмульсионных составах, включают гуммиарабик, пчелиный воск, ланолин, лецитин и фосфатиды.

В одном варианте осуществления, композиции, включающие нуклеиновые кислоты, могут быть изготовлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия при использовании в настоящем документе относится к системе воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см. Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1). В способе согласно изобретению также могут использоваться липосомы для переноса и доставки антисмысловых олигонуклеотидов в требуемый участок.

Фармацевтические композиции и составы ингибиторов экспрессии для наружного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут использоваться стандартные фармацевтические носители, а также водные, порошковые или жирные основы и загустители, и т.д.

СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

Фармацевтические композиции, включающие MASP-2-ингибирующие средства, могут вводить различными способами в зависимости от того, какой способ введения, местный или системный, является наиболее подходящим для состояния, подлежащего лечению. Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению можно доставлять путем нанесения или включения композиций на поверхность имплантируемого медицинского устройства или внутрь него.

СИСТЕМНАЯ ДОСТАВКА

При использовании в настоящем документе термины "системная доставка" и "системное введение" включают, без ограничения, пероральные и парентеральные пути, в том числе внутримышечный (в/м), подкожный, внутривенный (в/в), внутриартериальный, ингаляционный, подъязычный, трансбуккальный, наружный, трансдермальный, назальный, ректальный, вагинальный и другие пути введения, которые эффективно обеспечивают распределение доставленного средства в одном или во множестве участков предполагаемого терапевтического воздействия. Предпочтительные пути системной доставки для композиций настоящего изобретения включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и ингаляционный. Следует понимать, что определенный способ системного введения для выбранных средств, применяемых в конкретных композициях согласно настоящему изобретению, будет определяться отчасти чувствительностью средства к путям метаболического превращения, которые ассоциируются с данным путем введения. Например, пептидергические средства может быть предпочтительнее вводить другими путями, нежели пероральным.

MASP-2-ингибирующие антитела и полипептиды можно доставлять в организм

субъекта, нуждающегося в этом, любыми подходящими способами. Способы доставки антител к MASP-2 и полипептидов включают введение пероральным, пульмональным, парентеральным (например, путем внутримышечной, внутрибрюшинной, внутривенной (в/в) или подкожной инъекции), ингаляционным (например, при использовании состава в форме тонкодисперсного порошка), трансдермальным, назальным, вагинальным, ректальным или подъязычным путями введения, при этом они могут быть включены в состав лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения.

В качестве репрезентативного примера, MASP-2-ингибирующие антитела и пептиды можно вводить в живой организм путем нанесения на оболочку тела, способную абсорбировать полипептиды, например, назальную, желудочно-кишечную и ректальную оболочки. Полипептиды, как правило, наносят на всасывающую оболочку в сочетании с усилителем проникновения (см., например, Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V.H.L., J. Controlled Release 73:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., J. Controlled Release 73:241, 1990). Например, STDHF представляет собой синтетическое производное фузидовой кислоты, стероидное поверхностно-активное вещество, которое по структуре подобно солям желчных кислот, и было использовано в качестве усилителя проникновения при назальной доставке (Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990).

MASP-2-ингибирующие антитела и полипептиды могут вводить вместе с другой молекулой, такой как липид, для защиты полипептидов от ферментативного расщепления. Например, ковалентное присоединение полимеров, в особенности полиэтиленгликоля (ПЭГ), использовали для защиты некоторых белков от ферментативного гидролиза в организме и, таким образом, увеличения полупериода существования (Fuertges, F., et al., J. Controlled Release 77:139, 1990). Сообщалось о многих полимерных системах для доставки белков (Bae, Y.H., et al., J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 75:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

Недавно были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке и увеличенным полупериодом существования в кровотоке (см., например, патент США 5,741,516 за авторством Webb). Кроме того, рассматривались различные способы применения липосомных и липосомо-подобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (см., например, патент США 5,567,434 за авторством Szoka; патент США 5,552,157 за авторством Yagi; патент США 5,565,213 за авторством Nakamori; патент США 5,738,868 за авторством Shinkarenko; и патент США 5,795,587 за авторством Gao).

В случае трансдермальных применений MASP-2-ингибирующие антитела и полипептиды можно комбинировать с другими подходящими компонентами, такими как

носители и/или адъюванты. Нет никаких ограничений на природу таких других ингредиентов, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми для их предполагаемого введения, и не должны препятствовать активности действующих ингредиентов композиции. Примеры подходящих несущих сред для доставки включают мази, кремы, гели или суспензии, с очищенным коллагеном или без него. MASP-2-ингибирующими антителами и полипептидами также можно пропитывать трансдермальные пластыри, обычные пластыри и бинты, предпочтительно в жидкой или полужидкой форме.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить системно на периодической основе с интервалами, установленными для поддержания требуемого уровня терапевтического эффекта. Например, композицию можно вводить путем подкожной инъекции каждые две-четыре недели или реже. Схема применения определяется врачом с учетом различных факторов, которые могут влиять на действие комбинации средств. Такие факторы включают степень прогрессирования состояния, подвергаемого лечению, возраст, пол и массу тела пациента, и другие клинические факторы. Дозировка каждого отдельного средства будет изменяться в зависимости от MASP-2-ингибирующего средства, который включают в композицию, а также от присутствия и свойств любой несущей среды для доставки лекарственного средства (например, несущей среды для доставки с пролонгированным высвобождением). Кроме того, величину дозы можно корректировать, чтобы учесть различия в частоте введения и фармакокинетических свойствах доставляемого средства (средств).

МЕСТНАЯ ДОСТАВКА

В настоящем документе термин "местный" включает применение препарата на участке предполагаемого локализованного действия или вокруг него, и может включать, например, наружную доставку на кожу или другие пораженные ткани, офтальмологическую доставку, интратекальное (ИТ), интрацеребральновентрикулярное (ИЦВ), внутрисуставное, внутриполостное, внутричерепное или внутривестибулярное введение, наложение или орошение. Местное введение может быть предпочтительным для обеспечения введения более низкой дозы, что позволяет избежать системных побочных эффектов, и для более точного контроля времени доставки, а также концентрации действующих веществ на участке местной доставки. Местное введение создает известную концентрацию на участке-мишени, независимо от межиндивидуальных различий пациентов по обмену веществ, циркуляции крови и т.д. Улучшение контроля дозы также обеспечивается режимом прямой доставки.

Местная доставка MASP-2-ингибирующего средства может быть достигнута в контексте хирургических методов лечения заболевания или нарушения, вызванного или осложненного фиброзом и/или воспалением, как, например, в ходе таких процедур, как хирургическое вмешательство.

СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ

В профилактических применениях фармацевтические композиции, включающие

MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело или MASP-2-ингибирующее низкомолекулярное соединение) вводят субъекту, подверженному риску или иным образом склонному к развитию вызванного коронавирусом острого респираторного дистресс-синдрома или вызванного вирусом гриппа острого респираторного дистресс-синдрома, в количестве, достаточном для подавления MASP-2-зависимой активации комплемента и, таким образом, уменьшения, устранения или снижения риска появления симптомов респираторного синдрома. Как в профилактических, так и в терапевтических схемах, композиции, включающие MASP-2-ингибирующие средства, могут вводить в нескольких дозировках, пока у субъекта не будет достигнут достаточный терапевтический результат. Применение ингибирующих композиций MASP-2 согласно настоящему изобретению может быть выполнено при однократном введении композиции или ограниченной последовательности введений, для лечения острого состояния, связанного с фиброзом и/или воспалением. В альтернативе композицию можно вводить с периодическими интервалами в течение длительного периода времени для лечения хронических заболеваний, связанных с фиброзом и/или воспалением.

Как в профилактических, так и в терапевтических схемах, композиции, включающие MASP-2-ингибирующие средства, могут вводить в нескольких дозировках, пока у субъекта не будет достигнут достаточный терапевтический результат. В одном варианте осуществления изобретения, MASP-2-ингибирующее средство включает антитело к MASP-2, которое предпочтительно можно вводить взрослому пациенту (например, взрослому со средним весом 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000, более предпочтительно от 0,1 мг до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 1000 мг и еще более предпочтительно от 50,0 мг до 500 мг. В случае пациентов педиатрического профиля дозу можно корректировать пропорционально весу пациента. Применение ингибирующих композиций MASP-2 согласно настоящему изобретению может быть выполнено при однократном введении композиции или ограниченной последовательности введений, для лечения острого состояния, связанного с фиброзом и/или воспалением. В альтернативе композицию можно вводить с периодическими интервалами в течение длительного периода времени для лечения хронических заболеваний, связанных с фиброзом и/или воспалением.

Как в профилактических, так и в терапевтических схемах, композиции, включающие MASP-2-ингибирующие средства, могут вводить в нескольких дозировках, пока у субъекта не будет достигнут достаточный терапевтический результат.

VI. Применение комплекса MASP-2/C1-INH в качестве биомаркера тяжелого COVID-19

В другом аспекте изобретения предложен биомаркер для MASP-2-опосредованной активации лектинового пути, а именно, жидкофазный комплекс MASP-2/C1-INH, изменение присутствия и/или концентрации которого связано с присутствием или риском развития острого заболевания, связанного с инфекцией COVID-19, присутствием или

риском развития одного или больше долгосрочных осложнений, связанных с инфекцией COVID-19 и/или клинически значимым лечением инфекции COVID-19 с применением ингибитора комплемента. Также предложены композиции, наборы и способы определения концентрации жидкофазного комплекса MASP-2/C1-INH в биологической жидкости, такой как биологическая жидкость, полученная у субъекта, инфицированного COVID-19. Композиции и способы могут применяться, помимо прочего, для оценки риска развития острого заболевания, связанного с COVID-19, диагностики COVID-19 и/или вызванного COVID-19 долгосрочного осложнения, контроля прогрессирования или уменьшения связанного с COVID-19 заболевания и/или контроля ответа на лечение с применением ингибитора комплемента, такого как ингибитор MASP-2, или для оптимизации такого лечения.

Как описано в Примерах 25-30 в настоящем документе, для определения состояния активации эффекторного фермента лектинового пути (LP) - человеческого MASP-2 (представленного как SEQ ID NO:6), использовали особенность, связанную с преимуществом того, что ингибитор человеческого C1 (C1-INH) (представленный как SEQ ID NO:86), который действует как псевдосубстрат при активации MASP-2, образует ковалентный жидкофазный комплекс MASP-2/C1-INH. Таким образом, уровень комплекса MASP-2/C1-INH в образце плазмы или сыворотки крови обеспечивает четкий показатель недавней активации LP.

Как описано в Примерах 25-30, авторы изобретения обнаружили, что концентрации MASP-2/C1-INH в крови (например, сыворотке и/или плазме) аномально повышены у пациентов с тяжелым COVID-19 и также у субъектов, ранее инфицированных COVID-19 и страдающих долгосрочными осложнениями. Авторы изобретения также обнаружили, что после выздоровления концентрация комплекса MASP-2/C1-INH в большинстве случаев снижается до нормальных уровней. Как далее описано в Примерах 29 и 30, авторы изобретения определили, что субъекты, страдающие острым COVID-19, имели высокий уровень MASP-2/C1-INH до лечения нарсоплимабом, который быстро снизились после лечения нарсоплимабом. Авторы изобретения предполагают, что наблюдение пациента, инфицированного SARS-CoV-2, на предмет повышения концентрации комплекса MASP-2/C1-INH, полезно для диагностики у пациента присутствия или риска развития острого COVID-19, а также для диагностики у субъекта присутствия или риска развития постострого COVID-19 (также называемого синдромом долгого COVID-19) и, необязательно, лечения субъекта, у которого идентифицирован такой риск, с применением ингибитора комплемента, такого как ингибитор MASP-2. Мониторинг статуса комплекса MASP-2/C1-INH также может быть полезен для определения, отвечает ли пациент COVID-19 на терапию ингибитором комплемента, таким как ингибитор MASP-2, и, необязательно, для подбора дозы ингибитора MASP-2 при необходимости, чтобы привести уровень MASP-2/C1-INH в диапазон нормальных значений.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены, помимо прочего, композиции, наборы и способы измерения

количества комплекса MASP-2/C1-INH в качестве биомаркера MASP-2-опосредованный активации лектинового пути, и концентрация которого в биологической жидкости патологически повышена у пациентов, страдающих острым заболеванием COVID-19, связанныи с инфекцией SARS-Cov2, и/или у субъектов, ранее инфицированных SARS-Cov2 и страдающих или подвергающихся риску развития осложнений долгого COVID-19.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на моноклональное антитело (мАт C#7 или мАт C#8), которое специфично связывается с MASP-2 и способно связываться с MASP-2 в комплексе с C1-INH (также называемым комплексом MASP-2/C1-INH), и применение этого антитела в способах обнаружения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце. В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на иммунолоанализ, включающий применение специфичного моноклонального антитела к MASP-2 и C1-INH-специфичного антитела для измерения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH у субъекта-млекопитающего, страдающего или подвергающегося риску развития инфекции, вызванной коронавирусом или вирусом гриппа, для определения статуса активации лектинового пути, необязательно до и после лечения ингибитором комплемента, таким как ингибитор MASP-2, такой как MASP-2-ингибирующее антитело, (например, нарсоплимаб), где MASP-2-ингибирующее антитело способно ингибировать лектиновый путь.

В одном варианте осуществления присутствие или количество комплекса MASP-2/C1-INH может применяться в качестве биомаркера для определения присутствия или риска развития тяжелого COVID-19 или долгого COVID-19 у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, где более высокий уровень MASP-2/C1-INH у субъекта по сравнению с нормальным неинфицированным субъектом или выборкой субъектов, или пороговым значением, указывает, что субъект страдает тяжелым COVID-19 или имеет более высокий риск развития тяжелого COVID-19, или страдает долгим COVID-19, или имеет повышенный риск развития долгого COVID-19. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора комплемента субъекту, у которого определен повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ определения эффективности ингибитора комплемента, такого как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб), и/или контроля введения доз у субъекта, проходящего лечение ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает коронавирусом, таким как COVID-19, или вирусом гриппа или другим заболеванием или нарушением лектинового пути (например, ТГСК-TMA, IgAN, GvHD или другим заболеванием или нарушением лектинового пути).

A. Моноклональные антитела против MASP-2 для применения в высокочувствительном анализе ИФА и анализе на основе гранул для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце

Как описано в Примерах 25-30 в настоящем документе, авторы изобретения

создали мАт антитело против MASP-2, клоны #C7 и #C8, подходящие для применения в анализах для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH и способах, описанных в настоящем документе.

Как описано в Примере 25 и 26, были клонированы и секвенированы фрагменты вариабельной области тяжелой и легкой цепей клон мАта #C7 и клон мАта #C8.

Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи мАт против MASP-2, клона #C7 и клона #C8, приведены ниже.

SEQ ID NO:87: вариабельная область HC клон мАта #C7

SEQ ID NO:88: вариабельная область LC клон мАта #C7

SEQ ID NO:97: вариабельная область HC клон мАта #C8

SEQ ID NO:98: вариабельная область LC клон мАта #C8

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 в комплексе с C1-INH, где указанное антитело включает: (a) HC-CDR1, HC-CDR-2 и HC-CDR2 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и LC-CDR1, LC-CDR-2, LC-CDR-3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO: 88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR-2 и HC-CDR2 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и LC-CDR1, LC-CDR-2, LC-CDR-3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98. В одном варианте осуществления выделенное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую HC-CDR-1, включающую SEQ ID NO:89, HC-CDR2, включающую SEQ ID NO:90, и HC-CDR3, включающую SEQ ID NO:91, и вариабельную область легкой цепи, включающую LC-CDR1, включающую SEQ ID NO:92, LC-CDR2, включающую SEQ ID NO:83, и LC-CDR3, включающую SEQ ID NO:94. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 является гуманизированным, химерным или полностью человеческим антителом. В одном варианте осуществления фрагмент антитела против MASP-2 выбран из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 представляет собой одноцепочечную молекулу. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент помечены детектируемой молекулой, например, детектируемой молекулой, подходящей для применения в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент иммобилизованы на подложке, такой как подложка, подходящая для использования в иммуноанализе, как дополнительно описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент (т.е. антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH) включают связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:87, и

включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:88, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент (т.е. антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH) включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:98, где CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает связывающий домен, включающий следующие шесть CDR-областей: (a) HC-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89; (b) HC-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, (c) HC-CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91; (d) LC-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92; (e) LC-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93, и (f) LC-CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94.

В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:87 или SEQ ID NO:97. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент включает VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:88. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает VH, включающую SEQ ID NO:87, и VL, включающую SEQ ID NO:88 или SEQ ID NO:98.

В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает связывающий домен, включающий следующие шесть CDR-областей: (a) HC-CDR1, включающую SEQ ID NO:89, (b) HC-CDR2, включающую SEQ ID NO: 90; (c) HC-CDR3, включающую SEQ ID NO: 91; (d) LC-CDR1, включающую SEQ ID NO:92, (e) LC-CDR2, включающую SEQ ID NO:93, и (f) LC-CDR3, включающую SEQ ID NO:94. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает VH-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:87. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает VL-домен, обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей

мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:88. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент включает VH, включающую SEQ ID NO:87, и VL, включающую SEQ ID NO:88.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи антитела против MASP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:95, и где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи антитела против MASP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:96, и где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен вектор клонирования или экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с MASP-2 человека, где: (a) вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:87, а вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:88, или (b) где аминокислотная последовательность представлена как SEQ ID NO:97, а вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложена клетка, включающая вектор клонирования или экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую определяющие комплементарность области (CDR) вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с MASP-2 человека, где: (a) вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:87, а вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO N0:88, или (b) где вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:97, а вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO N0:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кабата.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения антитела против MASP-2, включающий культивирование клетки, содержащей вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или оба полипептида тяжелой и легкой цепей антител MASP-2 или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе. Клетку или культуру клеток культивируют при условиях и в течение 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 культивировали клетку или клетки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена композиция, включающая любое из антител против MASP-2 или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена подложка для применения в иммуноанализе, включающая по меньшей мере одно или больше антител против MASP-2 или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор для обнаружения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, таком как биологический образец, где указанный набор включает: (a) по меньшей мере один контейнер и (b) по меньшей мере одно или больше из любых антител MASP-2 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор включает антитело против MASP-2, включающее связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR1, HC-CDR-2 и HC-CDR2 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и LC-CDR1, LC-CDR-2, LC-CDR-3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR-2 и HC-CDR2 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и LC-CDR1, LC-CDR-2, LC-CDR-3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98. В некоторых вариантах осуществления набор включает антитело против MASP-2, включающее связывающий домен, включающий следующие шесть CDR-областей: (a) HC-CDR1, включающую SEQ ID NO:89, (b) HC-CDR2, включающую SEQ ID NO: 90; (c) HC-CDR3, включающую SEQ ID NO: 91; (d) LC-CDR1, включающую SEQ ID NO:92, (e) LC-CDR2, включающую SEQ ID NO:93, и (f) LC-CDR3, включающую SEQ ID NO:94. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает по меньшей мере одно антитело, которое специфично связывается с C1-INH.

Антитела против MASP-2, меченные детектируемой группой

В другом аспекте изобретения предложены антитела против MASP-2 (например, клон мАт #C7 или клон мАт #C8), которые помечены детектируемой группой (т.е. группой, которая позволяет производить обнаружение и/или количественное

определение). В различных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, конъюгированы с детектируемой меткой, которая может быть обнаружена напрямую или ненапрямую. В этом отношении "конъюгат" антитела относится к антителу против MASP-2, которое ковалентно связано с детектируемой меткой. В настоящем изобретении моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и производные антител, такие как антитело в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента или эпитоп-меченное антитело, могут быть ковалентно связаны с детектируемой меткой. При "прямом обнаружении", используется только одно детектируемое антитело, т.е. первичное детектируемое антитело. Таким образом, прямое обнаружение означает, что антитело, которое конъюгировано с детектируемой меткой, может быть обнаружено, фактически, без необходимости в добавлении второго антитела (вторичного антитела).

"Детектируемая метка" представляет собой молекулу или материал, который может давать детектируемый (например, визуально, электронно или иным образом) сигнал, который указывает на присутствие и/или концентрацию метки в образце. При конъюгировании с антителом детектируемая метка может использоваться для локализации и/или количественного определения мишени, на которую направлено специфичное антитело. Таким образом, присутствие и/или концентрация мишени в образце могут быть определены путем детектирования сигнала, генерируемого детектируемой меткой. Детектируемую метку можно обнаруживать напрямую или ненапрямую, при этом несколько разных детектируемых меток, конъюгированных с разными специфичными антителами, могут использоваться в комбинации для обнаружения одной или более мишеней.

Примеры детектируемых меток, которые можно детектировать напрямую, включают флуоресцентные красители, радиоактивные вещества и частицы металлов. Напротив, непрямое детектирование требует применения одного или больше дополнительных антител, т.е. вторичных антител, после применения первичного антитела. Таким образом, детектирование проводят путем обнаружения связывания вторичного антитела или связывающего средства с первичным детектируемым антителом. Примеры первично детектируемых связывающих средств или антител, требующих добавления вторичного связывающего средства или антитела, включают ферментативно детектируемые связывающие средства и связывающие средства или антитела, детектируемые с помощью гаптенов.

Примеры детектируемых меток, которые могут быть конъюгированы с антителами согласно настоящему изобретению, включают флуоресцентные метки, ферментные метки, радиоизотопы, хемилюминесцентные метки, электрохемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки, полимеры, полимерные частицы, частицы металлов, гаптены и красители.

Примеры флуоресцентных меток включают 5-(и 6)-карбоксифлуоресцеин, 5- или 6-карбоксифлуоресцеин, 6-(флуоресцеин)-5-(и 6)-карбоксамидогексановую кислоту,

флуоресцеинизотиоцианат, родамин, тетраметилродамин и красители, такие как Cy2, Cy3 и Cy5, необязательно замещенный кумарин, включая AMCA, PerCP, фикобилипротеины, включая R-фикоэритрин (RPE) и аллофикоэритрин (APC), Texas Red, Princeton Red, зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его аналоги, а также 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, ПММА или диоксида кремния, в которые могут быть включены флуоресцентные красители, или полимерные мицеллы или капсулы, которые содержат красители, ферменты или субстраты.

Примеры меток с частицами металлов включают частицы золота и покрытые частицы золота, которые можно преобразовывать при использовании серебряных красителей. Примеры гаптенов включают DNP, флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), биотин и дигоксигенин. Примеры ферментных меток включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (ALP или AP), β-галактозидазу (GAL), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, β-N-ацетилглюкозамидазу, β-глюкуронидазу, инвертазу, ксантиноксидазу, люциферазу светляка и глюкозо-оксидазу (GO). Примеры субстратов, обычно используемых для пероксидазы хрена, включают 3,3'-диаминобензидин (DAB), диаминобензидин с контрастированием никелем, 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), бензидин дигидрохлорид (BDHC), реактив Ханкера-Йетса (HYR), индофановый синий (IB), тетраметилбензидин (TMB), 4-хлор-1-нафтол (CN), альфа-нафтолпиронин (альфа-NP), о-дианизидин (OD), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), нитросиний тетразолий (NBT), 2-(п-иодфенил)-3-п-нитрофенил-5-фенилтетразолий хлорид (INT), тетранитросиний тетразолий (TNBT), 5-бром-4-хлор-3-индоксил-бета-D-галактозид/ферроферрицианид (BCIG/FF).

Примеры субстратов, обычно используемых для щелочной фосфатазы, включают нафтол-AS-B1-фосфат/fast red TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/fast red TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/-fast red TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/fast red TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/new fuschin (NABP/NF), бромхлориндолилфосфат/нитросиний тетразолий (BCIP/NBT), 5-бром-4-хлор-3-индоксил-бета-D-галактопиранозид/ферро-феррицианид (BCIG/FF).

Примеры люминесцентных меток включают люминол, изолюминол, сложные эфиры акридиния, 1,2-диоксетаны и пиридопиридазины. Примеры электрохемилюминесцентных меток включают производные рутения. Примеры радиоактивных меток включают радиоактивные изотопы иода, кобальта, селена, трития, углерода, серы и фосфора.

Детектируемые метки могут быть соединены с антителами, описанными в настоящем документе (т.е. с любыми антителами против MASP-2 или антителами против C1-INH), или с любой другой молекулой, которая специфично связывается с представляющим интерес биологическим маркером, например, антителом, нуклеотидным

зондом или полимером. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что детектируемые метки также могут быть конъюгированы со вторым и/или третьим, и/или четвертым, и/или пятым связывающими средствами или антителами и т.д. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что каждое дополнительное связывающее средство или антитело, используемые для анализа представляющего интерес биологического маркера, могут служить для усиления сигнала. Биологический маркер можно обнаруживать визуально при использовании, например, световой микроскопии, флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии, где вещество представляет собой, например, краситель, частицу коллоидного золота, люминесцентный реагент. Визуально детектируемые вещества, связанные с биологическим маркером, также можно обнаруживать с помощью спектрофотометра. Если детектируемым веществом является радиоактивный изотоп, обнаружение может осуществляться визуально с помощью авторадиографии или невизуально при использовании 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 MASP-2 (например, клон мАт #C7, клон мАт #C8 или антитело против C1-INH) не имеет метки (т.е. является голым), и его присутствие можно обнаруживать с помощью меченого антитела, которое связывается с антителом против MASP-2 или антителом против C1-INH.

B. Композиции и наборы для измерения комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце

Композиции

В другом аспекте настоящего изобретения предложена подложка, такая как твердая подложка (например, нерастворимая подложка, такая как неводная матрица, такая как пластина из стекла или предметное стекло, полисахариды (например, агароза), полиакриламиды, полистирол, пластик или металл, гранула с полимерным покрытием, трубка или керамический или металлический чип), которая включает иммобилизованные (или иным образом нанесенные) моноклональные антитела против MASP-2, раскрытые в настоящем документе (такие как антитела против MASP-2, которые связываются с MASP-2 в комплексе с C1-INH, например, клон мАт #C7 или клон мАт #C8). В некоторых вариантах осуществления антитела против MASP-2 иммобилизованы (или нанесены) на дискретные участки (например, в лунки многолуночного планшета или нанесены в виде матрицы на биочип). В некоторых вариантах осуществления подложка, включающая антитела против MASP-2, может входить в набор для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном от субъекта-млекопитающего.

Наборы

В другом аспекте настоящего изобретения предложены наборы для применения при выполнении одного или более анализов, раскрытых в настоящем документе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор (т.е.

упакованная комбинация реагентов в заданных количествах) с реагентами и инструкциями по обнаружению присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, таком как биологический образец. Иллюстративные наборы могут содержать по меньшей мере одно моноклональное антитело против MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе (т.е. клон мАт #C7 или клон мАт #C8) и по меньшей мере одно антитело против C1-INH. Если антитело против MASP-2 или антитело против C1-INH помечено детектируемой молекулой, такой как фермент, набор будет включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который дает детектируемой 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 варьировать в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут поставляться в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая вспомогательные вещества, которые при растворении дают раствор реагента, имеющий подходящую концентрацию.

Кроме того, наборы могут включать учебные материалы, раскрывающие способы применения антитела согласно настоящему изобретению (например, для обнаружения комплексов MASP-2/C1-INH или их отсутствия). Например, набор может дополнительно содержать средства детектирования метки (например, ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как HRP-конъюгат антитела овцы против иммуноглобулина мыши и т.п.). Наборы могут дополнительно включать буферы и другие реагенты, обычно используемые при практической реализации конкретного иммуноанализа, как известно в уровне техники.

Некоторые варианты осуществления обеспечивают наборы для обнаружения присутствия или количества MASP-2/C1-INH в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно антитело против MASP-2, как описано в настоящем документе, такое как антитело или фрагмент, включающие CDR-области из клона #C7, как указано в ТАБЛИЦЕ 5, или антитело или его фрагмент, включающие CDR-области из клона #C8. В некоторых вариантах осуществления набор может включать буферы, ферменты, метки, субстраты, гранулы или другие поверхности, к которым прикреплены антитела согласно изобретению, и т.п., а также инструкции по применению.

Некоторые варианты осуществления обеспечивают наборы для обнаружения присутствия или количества MASP-2/C1-INH в биологическом образце, где наборы содержат по меньшей мере одно антитело против MASP-2, как описано в настоящем документе, такое как антитело или его фрагмент, включающие CDR-области из MASP-2-специфичного клона мАт #C7, как указано в ТАБЛИЦЕ 5, или антитело или его фрагмент, включающие CDR-области из клона #C8. Рассматриваемые антитела против MASP-2 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены любым подходящим

детектируемым фрагментом, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор может включать буферы, ферменты, метки, субстраты, гранулы или другие поверхности, к которым прикреплены антитела согласно изобретению, и т.п., а также инструкции по применению.

Предметы в наборе могут быть отдельно завернуты или упакованы в отдельные ячейки, которые поставляются вместе в более крупном контейнере (например, в картонной или пенополистирольной коробке).

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор для измерения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, где набор включает по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое специфично связывается с MASP-2 в иммуноанализе, и, необязательно, специфичное антитело против C1-INH или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с C1-INH. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент включает связывающий домен, включающий HC-CDR-1, HC-CDR-2 и HC-CDR-3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR-1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:88, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент включают связывающий домен, включающий HC-CDR-1, HC-CDR-2 и HC-CDR-3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR-1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

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

В некоторых вариантах осуществления набор предназначен для проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент представляет собой покрывающее антитело. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 или его фрагмент представляет собой детектирующее антитело. В одном варианте осуществления C1-INH-специфичное антитело или его фрагмент представляет собой покрывающее антитело. В одном варианте осуществления C1-INH-специфическое антитело или его фрагмент представляет собой детектирующее антитело. В одном варианте осуществления антитело против MASP-2 представляет собой антитело для покрытия/захвата и включает связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR-1, HC-CDR-2 и HC-CDR-3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR-1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR-1, HC-CDR-2 и HC-CDR-3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR-1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой

нумерации Кэбата, и иммобилизовано на подложке, такой как твердая подложка (например, нерастворимая подложка, такая как неводная матрица, такая как пластина из стекла или предметное стекло, полисахариды (например, агароза), полиакриламиды, полистирол, пластмасса или металл, гранула с полимерным покрытием, трубка, керамический или металлический чип).

В некоторых вариантах осуществления набор предназначен для проведения иммунофлуоресцентного анализа на основе гранул, такого как анализ Luminex, и включает: (i) по меньшей мере одно антитело против MASP-2, такое как мАт #C7 или мАт #C8, иммобилизованное на гранулах (таких как полистирольные микросферы или магнитные полистирольные микросферы), подходящие для захвата комплексов MASP-2/C1-INH из сыворотки или плазмы крови человека. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает: (ii) по меньшей мере одно антитело против C1-INH для применения в качестве детектирующего антитела для обнаружения захваченных комплексов. В одном варианте осуществления набор дополнительно включает: (iii) антитело против C1s, подходящее для захвата комплексов C1s/C1-INH из сыворотки или плазмы крови человека.

В различных вариантах осуществления наборов согласно изобретению рассматриваемые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены любой подходящей детектируемой молекулой, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает буферы, ферменты, метки, субстраты, гранулы (такие как полистирольные микросферы или магнитные полистирольные микросферы) или другие поверхности, к которым прикреплены антитела согласно изобретению, и т.п., а также инструкции по применению.

C. Способы обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце

Как описано в настоящем документе, авторы изобретения создали антитела против MASP-2, которые подходят для применения в иммуноанализе для обнаружения присутствия и/или количества MASP-2/C1-INH в биологическом образце, таком как биологический образец, полученный у субъекта-млекопитающего.

В одном аспекте антитела против MASP-2 (например, клон мАт #C7 или клон мАт #C8) согласно настоящему изобретению применяют в иммуноанализе in vitro для анализа исследуемого образца, такого как биологический образец, полученный у исследуемого субъекта, на присутствие или количество комплекса MASP-2/C1-INH. В таких иммуноанализах in vitro антитело против MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент может быть голым или может быть помечено детектируемой молекулой, как описано в настоящем документе, и может использоваться в жидкой фазе или связаное с подложкой, как описано ниже. В рамках анализа in vitro может использоваться антитело любого типа, такое как мышиное, химерное, гуманизированное или человеческое, поскольку не нужно учитывать иммунный ответ хозяина.

Антитела согласно настоящему изобретению могут применяться в любом известном методе иммуноанализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямые

и непрямые сэндвич-анализы, иммунохроматографические анализы (например, в формате тест-полосок), анализы на основе гранул и иммунопреципитационные анализы (см., например, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Сэндвич-анализы включают использование двух антител, каждое из которых способно связываться с разными иммуногенными частями детектируемого комплекса MASP-2/C1-INH. В сэндвич-анализе аналит в тестируемом образце связывается с первым антителом (например, антителом против MASP-2, таким как клон #C7 или клон #C8), которое иммобилизовано на твердом носителе (например, подложке), и после этого второе антитело связывается с C1-INH, с образованием в результате нерастворимого тройного комплекса. Второе антитело может быть само помечено детектируемой молекулой (прямой сэндвич-анализ) или может быть измерено при использовании антитела против иммуноглобулина, которое помечено детектируемой молекулой (непрямой сэндвич-анализ).

Например, одним из предпочтительных типов сэндвич-анализа является анализ ИФА, в таком случае детектируемой молекулой является фермент. Анализы ИФА, независимо от используемой системы обнаружения, обычно включают иммобилизацию антигена или антитела на подложке (например, твердом носителе), а также применение соответствующего детектирующего реагента. В анализе ИФА реакция белок-антиген-антитело проходит на подложке (например, твердом носителе), как правило, в лунках титрационных микропланшетов. Антиген и такое первое антитело, также называемое покрывающим или захватывающим антителом, реагируют и образуют стабильный комплекс, который можно визуализировать при добавлении второго антитела, называемого детектирующим антителом, которое может быть напрямую или ненапрямую связано с ферментом. Добавление субстрата для этого фермента приводит к появлению цветного окрашивания, которое можно измерять фотометрически.

В одном варианте осуществления антитела против MASP-2 согласно изобретению (например, клон #C7 или клон #C8) используются в качестве покрывающих/захватывающих антител для обнаружения присутствия комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образец с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (см., например, Gold et al., J Clin Oncol. 24:252-58, 2006).

В прямом конкурентном ИФА чистый или получистый препарат антигена связывают на подложке, которая нерастворима в тестируемой жидкости или клеточном экстракте, и добавляют определенное количество меченого детектируемой меткой растворимого антитела для обнаружения и/или количественного определения бинарного комплекса, образовавшегося между связанным на подложке антигеном и меченым антителом.

В отличие от этого, "двухдетерминантный" ИФА, также известный как "двухсайтовый ИФА" или "сэндвич-анализ", требует малых количеств антигена, при этом сам анализ не требует полной очистки антигена. Таким образом, двухдетерминантный

ИФА предпочтительнее прямого конкурентного ИФА для обнаружения антигена в клиническом образце. См., например, публикации о применение двухдетерминантного ИФА для количественного определения онкопротеина c-myc в образцах биопсии (Field et al., Oncogene 4: 1463 (1989); Spandidos et al., Anticancer Res. 9: 821 (1989)). В двухдетерминантном ИФА некоторое количество немеченого моноклонального антитела или фрагмента антитела ("захватывающее антитело") связывают на подложке (например, твердом носителе), исследуемый образец приводят в контакт с захватывающим антителом и добавляют определенное количество меченого детектируемой меткой растворимого антитела (или фрагмента антитела), что обеспечивает обнаружение и/или количественное определение тройного комплекса, образованного между захватывающим антителом, антигеном и меченым антителом.

В одном варианте осуществления захватывающее антитело, связанное на подложке (например, твердом носителе), представляет собой антитело против MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, которое связывается с MASP-2 в комплексе с C1-INH. В одном варианте осуществления захватывающее антитело, связанное на подложке (например, твердом носителе), представляет собой MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе. Способы проведения двухдетерминантного ИФА хорошо известны специалистам 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 двухдетерминантном ИФА растворимое антитело или фрагмент антитела должны связаться с эпитопом в комплексе MASP-2/C1-INH, который отличается от эпитопа, распознаваемого захватывающим антителом. Двухдетерминантный ИФА можно проводить для определения, присутствует ли комплекс MASP-2/C1-INH в тестируемом биологическом образце, таком как физиологическая жидкость (например, кровь, плазма или сыворотка) или образец биопсии. В альтернативе этот анализ можно проводить для количественного определения комплекса MASP-2/C1-INH, присутствующего в клиническом образце физиологической жидкости. Количественный анализ можно проводить при включении разведений комплекса MASP-2/C1-INH.

Можно проводить иммуноанализы in vitro, в которых по меньшей мере одно MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с подложкой (например, твердофазным носителем). Например, MASP-2-специфичные моноклональные антитела или их фрагменты могут быть прикреплены к полимеру, такому как аминодекстран, для связывания моноклонального антитела с нерастворимой подложкой, такой как гранулы с полимерным покрытием, планшеты, пробирки или керамический или металлический чип. В одном варианте осуществления подложка подходит для применения в методе ИФА (например, в многолуночном микротитрационном планшете). В одном варианте осуществления подложка представляет собой гранулу (например, полистирольную микросферу или магнитную полистирольную

микросферу) для применения в иммунофлуоресцентном анализе на основе гранул, таком как анализ Luminex, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен иммуноанализ для обнаружения комплексов MASP-2/C1-INH и C1s/C1-INH, где MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним набором гранул, а C1s-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны со вторым набором гранул.

Другие подходящие анализы in vitro будут очевидны для специалистов в данной области. Конкретные концентрации меченого детектируемой меткой антитела против MASP-2 или C1-INH-специфичного антитела, температура и время инкубирования, а также другие условия анализа могут изменяться в зависимости от различных факторов, включая концентрацию комплекса MASP-2/C1-INH в образце, природу образца и т.п. Специалисты в данной области сумеют определить рабочие и оптимальные условия анализа для каждого определения путем проведения стандартных экспериментов.

Анализы для обнаружения и/или измерения комплекса MASP-2/C1-INH

В соответствии с вышеизложенным в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ определения присутствия или количества MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, таком как биологический образец, где способ включает: (a) контакт тестируемого образца с MASP-2-специфичным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в иммуноанализе in vitro; (b) контакт тестируемого образца с C1-INH-специфичным антителом и (c) обнаружение присутствия или отсутствия связывания указанного антитела к C1-INH, где присутствие связывания указывает на присутствие или количество комплекса MASP-2/C1-INH в образце.

В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-специфичное антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело, содержащее CDR-области из MASP-2-специфичного клона #C7, как указано в ТАБЛИЦЕ 5. В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, включающей SEQ ID NO:98.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает сравнение количества MASP-2/C1-INH, обнаруженного в соответствии с этапом (c), с референсным стандартом или контрольным образцом для определения уровня MASP-2/C1-INH в исследуемом образце.

В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или смешанный образец субъектов, страдающих заболеванием или

нарушением лектинового пути (например, COVID-19, ТГСК-ТМА, IgAN, GvHD или другим заболеванием или нарушением лектинового пути). В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или смешанный образец нормальных здоровых добровольцев. В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой исходный образец субъекта до лечения ингибитором комплемента (например, MASP-2-ингибирующим средством или другим ингибитором комплемента). В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке. В одном варианте осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ИФА. В одном варианте осуществления иммуноанализ представляет собой анализ на основе гранул, такой как анализ Luminex.

В одном варианте осуществления MASP-2-специфичное антитело помечено детектируемой молекулой, и стадия (b) включает обнаружение присутствия указанной детектируемой молекулы. В одном варианте осуществления указанное MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются голыми (т.е. не мечеными), и присутствие или количество антитела или его фрагмента, связанного с комплексом MASP-2/C1-INH, определяют с помощью меченого антитела, которое связывается с антителом к MASP-2. В одном варианте осуществления указанное MASP-2-специфичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммобилизованы на подложке (т.е. захват/покрытие), при этом связанный комплекс MASP-2/C1-INH детектируют вторым антителом, которое связывается с C1-INH, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления исследуемый образец представляет собой биологический образец, полученный у субъекта-млекопитающего. В различных вариантах осуществления биологический образец представляет собой образец жидкости, выбранный из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мокроты, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, клеточного лизата, асцитной жидкости, мочи и слюны. В одном варианте осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи и спинномозговой жидкости. Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления способы анализа и наборы подходят для измерения присутствия и/или количества MASP-2/C1-INH при низких концентрациях сыворотки (т.е. меньше 10% сыворотки, например, от 0,1% до 9%, например, от 0,5% до 8%, например, от 1% до 5%, например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% или 9% сыворотки).

В одном варианте осуществления субъект-млекопитающее (например, человек) инфицирован SARS-CoV-2 и страдает или подвергается риску развития тяжелого COVID-19 и/или долгого COVID-19.

В одном варианте осуществления субъект-млекопитающее (например, человек) прошел лечение ингибитором комплемента, таким как ингибитор комплемента лектинового пути, таким как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-

ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб), как дополнительно описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления субъект-млекопитающее (например, человек) страдает заболеванием или нарушением лектинового пути (например, COVID-19, ТГСК-TMA, IgAN, GvHD или другим заболеванием или нарушением лектинового пути).

Как описано в настоящем документе, способы обнаружения или измерения комплекса MASP-2/C1-INH в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения могут применяться для определения конечного фармакодинамического показателя или терапевтического порога, или определения необходимости лечения субъекта ингибитором комплемента, таким как ингибитор комплемента лектинового пути, такой как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, например, нарсоплимаб).

Хотя детали иммунологического анализа могут изменяться в зависимости от конкретного используемого формата, в одном варианте осуществления способ обнаружения MASP-2/C1-INH в исследуемом образце включает этапы контакта исследуемого образца с захватывающим антителом, которое специфично связывается с MASP-2. Антителу MASP-2 позволяют связаться с MASP-2/C1-INH в образце в иммунологически реактивных условиях, при этом присутствие связанного антитела определяют напрямую или ненапрямую с использованием антитела против C1-INH. MASP-2-специфичные антитела могут использоваться, например, в качестве захватывающего антитела в ИФА для анализа MASP-2/C1-INH или анализа на основе гранул, или в качестве второго антитела для связывания с MASP-2/C1-INH, который захвачен захватывающим антителом, которое связывается с C1-INH. Как известно в уровне техники, обычно затем определяют присутствие второго антитела. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ проводят на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой анализ ИФА. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой анализ на основе гранул.

D. Способы диагностики, мониторинга и лечения субъекта, страдающего или подверженного риску развития острого COVID-19, или страдающего или подверженного риску развития долгого COVID-19

Антитела, способы, реагенты и наборы против MASP-2 согласно изобретению можно применять в различных применениях. Например, в некоторых вариантах осуществления анализ согласно настоящему изобретению может применяться для оценки уровня MASP-2/C1-INH у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, с целью определения риска развития острого COVID-19 (т.е. острого респираторного дистресс-синдрома, пневмонии или какого-либо другое легочного или другого острого проявления COVID-19, такое как тромбоз), или вероятности выздоровления после острого COVID-19, и/или вероятности развития, или присутствия долгого COVID-19 (т.е. долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, выбранных из группы, состоящей из сердечно-сосудистых осложнений, неврологических осложнений, повреждения почек, легочных

осложнений, воспалительного состояния, такого как синдром Кавасаки, Кавасаки-подобный синдром, мультисистемный воспалительный синдром у детей, полиорганная недостаточность, крайняя утомляемость, мышечная слабость, субфебрильная температура, неспособность сконцентрироваться, провалы в памяти, изменения настроения, нарушения сна, покалывание в руках и ногах, диарея и рвота, потеря вкуса и обоняния, боль в горле и затруднения при глотании, первичное возникновение диабета и гипертензии, кожная сыпь, одышка, боли в груди и учащенное сердцебиение), и/или для оценки степени, в которой ингибитор пути комплемента, такой как ингибитор лектинового пути, такой как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб), влияет на уровень MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, и, таким образом, оценки степени активации лектинового пути у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления анализ согласно настоящему изобретению может применяться для оценки того, в какой степени ингибитор пути комплемента (например, MASP-2-ингибирующее средство) снижает активацию лектинового пути комплемента in vivo. В некоторых вариантах осуществления способ согласно изобретению проводят на биологическом образце, полученном у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления уровень комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженный в анализе согласно настоящему изобретению, сравнивают с подходящим референсным значением. Референсное значение может быть, например, значением, измеренным в образце, полученном у здорового пациента (или группы здоровых пациентов), или значением, измеренным в образце или пуле образцов, полученных у субъектов, страдающих тяжелой формой COVID-19, или значением, измеренным в образце, полученного у пациента с COVID-19, который проходит лечение MASP-2-ингибирующим средством (например, полученном до лечения или во время последовательности процедур), или референсное значение может быть получено из сыворотки здорового человека, которая была активирована средством, активирующим лектиновый путь (см. Пример 25), или референсное значение может быть установленным пороговым значением. В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или смешанный образец субъектов, страдающих острым COVID-19. В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой индивидуальный или смешанный образец нормальных здоровых добровольцев. В одном варианте осуществления контрольный образец представляет собой исходный образец субъекта до лечения ингибитором комплемента (например, MASP-2-ингибирующим средством или другим ингибитором комплемента). Как описано в настоящем документе, способы обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения могут применяться для оценки степени активации комплемента по лектиновому пути и, таким образом, для определения конечного фармакодинамического показателя или терапевтического порога ингибитора комплемента, или определения необходимости лечения субъекта ингибитором

комплемента, таким как ингибитор лектинового пути комплемента, такой как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб).

E. Способы оценки степени активации комплемента по лектиновому пути у субъекта-млекопитающего

В одном аспекте настоящего изобретения предложены способы оценки степени активации комплемента по лектиновому пути (APC) в исследуемом образце и проведения иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженного в исследуемом образце, указывает степень активации комплемента по лектиновому пути в исследуемом образце. В одном варианте осуществления исследуемый образец является биологическим образцом, полученным у субъекта-млекопитающего, и способ включает следующие этапы: (a) предоставление биологического образца, полученного у субъекта-млекопитающего; и (b) оценка степени активации лектинового пути у субъекта путем проведения иммуноанализа, включающего по меньшей мере одно из захвата и определения уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце в соответствии со способами изобретения, описанными в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления иммуноанализ включает захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, где комплекс MASP-2/C1-INH либо захватывают, либо детектируют моноклональным антителом, специфичным к MASP-2. В различных вариантах осуществления способ включает сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженного в исследуемом образце (например, биологическом образце), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженный в исследуемом образце, указывает степень активации комплемента по лектиновому пути в исследуемом образце (например, биологическом образце). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает использование результатов сравнительного анализа для получения диагностической, прогностической или связанной с лечением информации в отношении субъекта-млекопитающего, у которого был получен биологический образец. В некоторых вариантах осуществления исследуемый образец получен у субъекта, который в настоящее время инфицирован SARS-CoV-2, при этом способ применяют для оценки риска развития у указанного субъекта острого заболевания COVID-19, при котором уровень MASP-2/C1-INH повышен по меньшей мере на 20%, например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, не менее 100% или по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза или больше по сравнению с нормальным здоровым контролем (например, субъектом или группой субъектов, которые являются здоровыми и не инфицированы SARS-CoV-2), или референсный стандарт указывает на повышенный риск развития острого COVID-19 и/или долгого COVID-19 или на вероятность выздоровления у субъекта, страдающего острым COVID-19.

В некоторых вариантах осуществления исследуемый образец получен у субъекта, который был инфицирован SARS-CoV-2, при этом способ применяется для оценки риска развития у указанного субъекта долгого COVID-19, где уровень MASP-2/C1-INH, повышенный по меньшей мере в 2 раза или больше по сравнению с нормальным здоровым контролем, указывает на повышенный риск развития синдрома долгого COVID-19.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки влияния ингибитора человеческого комплемента на активацию лектинового пути комплемента in vivo. Любое соединение, которое связывает или иным образом блокирует образование и/или активность любого из компонентов комплемента человека, может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Например, ингибитор комплемента может быть, например, малой молекулой, нуклеиновой кислотой или аналогом нуклеиновой кислоты, пептидомиметиком или макромолекулой, которая не является нуклеиновой кислотой или белком, такой как антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки влияния на активацию альтернативного пути комплемента in vivo ингибитора (например, антитела или малой молекулы), специфичного к компоненту комплемента человека, такого как, например, ингибитор компонента комплемента, выбранного из группы, состоящей из C1 (C1q, C1r, C1s), C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, фактора D, фактора B, фактора P, МСЛ, MASP-1, MASP-2 и MASP-3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки влияния ингибитора альтернативного пути активации комплемента на активацию альтернативного пути комплемента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки влияния ингибитора MASP-2 на активацию лектинового пути комплемента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки влияния на активацию комплемента лектинового пути in vivo MASP-2-ингибирующего средства, которое уже вводили субъекту-млекопитающему. В различных вариантах осуществления субъекту-млекопитающему вводят MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело или низкомолекулярный ингибитор MASP-2), а затем получают биологический образец. Степень активации лектинового пути комплемента (LPC) в биологическом образце затем оценивают путем проведения иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце в соответствии со способом изобретения, описанным в настоящем документе.

F. Способы мониторинга эффективности MASP-2-ингибирующего средства у субъекта-млекопитающего

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ мониторинга эффективности лечения MASP-2-ингибирующим средством у субъекта-млекопитающего, включающий этапы: (a) введения дозы MASP-2-ингибирующего средства (т.е. антитела или малой молекулы) субъекту-млекопитающему в первый момент

времени; (b) оценку первой концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (a); (c) лечение субъекта MASP-2-ингибирующим антителом во второй момент времени; (d) оценку второй концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (c); и (e) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, определенного на этапе (b), с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH, определенным на этапе (d), с целью определения эффективности MASP-2-ингибирующего средства (антитела или малой молекулы) у субъекта-млекопитающего. В одном варианте осуществления степень активации лектинового пути у субъекта оценивают с помощью иммуноанализа, где иммуноанализ включает захват и определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце. Необязательно уровень комплекса MASP-2/C1-INH, определенный в биологическом образце, сравнивают с подходящим референсным значением. Референсное значение может быть, например, значением комплекса MASP-2/C1-INH, измеренным в биологическом образце, полученном у субъекта до введения MASP-2-ингибирующего антиетла, средним значением, измеренным в образцах, полученных у группы здоровые контрольных субъектов, значением, которое представляет требуемую степень активации лектинового пути (например, уровень MASP-2/C1-INH, соответствующий 90% ингибированию активации лектинового пути или 80% ингибированию, или 70% ингибированию, или 60% ингибированию, или 50% ингибированую активации лектинового пути). Например, первый биологический образец получают у субъекта до введения MASP-2-ингибирующего антитела, а второй биологический образец получают после введения MASP-2-ингибирующего антитела, и измеряют уровень комплекса MASP-2/C1-INH в образцах. Если уровень комплекса MASP-2/C1-INH во втором биологическом образце меньше уровня комплекса MASP-2/C1-INH в первом биологическом образце или ниже контрольного значения (например, порогового значения, соответствующего определенному проценту ингибирования активации лектинового пути), то можно сделать вывод, что MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует активацию лектинового пути в требуемой степени. В альтернативе, если уровень комплекса MASP-2/C1-INH во втором биологическом образце выше, чем уровень комплекса MASP-2/C1-INH в первом биологическом образце, или выше контрольного значения (например, порогового значения, соответствующее определенному проценту ингибирования активации лектинового пути), то можно сделать вывод, что нужно увеличить дозу MASP-2-ингибирующего антитела (например, нарсоплимаба), и, необязательно, способ дополнительно включает введение субъекту увеличенной дозы MASP-2-ингибирующего антитела (например, нарсоплимаба). В некоторых вариантах осуществления, если субъекту вводят увеличенную дозу MASP-2-ингибирующего антитела, этапы (b)-(e) повторяют, чтобы определить, является ли увеличенная доза MASP-2-ингибирующего антитела достаточной для регулирования уровня комплекса MASP-2/C1-INH до нужного уровня в сравнении с соответствующим контролем или референсным стандартом.

В некоторых вариантах осуществления способы применяются для контроля

эффективности MASP-2-ингибирующего антитела, которое вводят субъекту-человеку, страдающему заболеванием или нарушением лектинового пути, или подверженному риску его развития, например, когда заболевание или нарушение лектинового пути выбрано из группы, состоящей из острого COVID-19, долгого COVID-19 или других заболеваний или нарушений лектинового пути (например, ТГСК-ТМА, IgAN, GvHD или другого заболевания или нарушения лектинового пути).

G. Способы диагностики, мониторинга и лечения субъекта, страдающего или подверженного риску развития тяжелого COVID-19 или долгого COVID-19

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ определения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце биологической жидкости, полученном у субъекта, в настоящее время инфицированного SARS-CoV-2 или потенциально инфицированного SARS-CoV-2, или страдающего тяжелым COVID-19, или ранее инфицированного SARS-CoV-2, где способ включает: (a) контакт исследуемого образца биологической жидкости с антителом, которое связывается с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, в иммуноанализе in vitro; и (b) обнаружение присутствия или отсутствия, или количества антитела или его фрагмента, связанного с комплексом MASP-2/C1-INH с антителом, которое связывается с C1-INH, где обнаружение присутствия и/или количества MASP-2/C1-INH указывает на MASP-2-опосредованную активацию лектинового пути у субъекта.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ оценки степени активации лектинового пути комплемента, опосредованной MASP-2, в исследуемом образце биологической жидкости субъекта, в отношении которого известно, что он инфицирован SARS-CoV-2, потенциально инфицирован SARS-CoV-2, страдает тяжелым COVID-19 или был ранее инфицирован SARS-CoV-2, включающий: (a) предоставление исследуемого образца биологической жидкости, полученного у субъекта, в отношении которого известно, что он инфицирован SARS-CoV-2, потенциально инфицирован SARS-CoV-2, страдает тяжелым COVID-19 или был ранее инфицирован SARS-CoV-2; (b) проведение иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, и (c) сравнение присутствия и/или количества MASP-2/C1-INH, обнаруженного в исследуемом образце, с референсным стандартом, где присутствие или повышенное количество MASP-2/CI-INH по сравнению с референсным образцом указывает, что субъект имеет повышенную активацию MASP-2-опосредованного лектинового пути, что указывает на то, что: (i) субъект в настоящее время страдает MASP-2-опосредованным заболеванием COVID-19 и, вероятно, получит пользу при лечении ингибитором комплемента, таким как MASP-2-ингибирующее средство (антитело против MASP-2, такое как нарсоплимаб, или низкомолекулярный ингибитор MASP-2), или (ii) что субъект имеет повышенный риск развития осложнений, связанных с COVID-19, или (iii) что субъект ранее был инфицирован COVID-19 и страдает или подвергается риску развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, или (iv) что субъект в настоящее время страдает острым COVID-

19 и подвергается повышенному риску неблагоприятного исхода, например смерти. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту, имеющему повышенное количество комплекса MASP-2/C1-INH, терапевтического средства для лечения COVID-19, такого как средство, ингибирующее комплемент, такое как MASP-2-ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело или малая молекула, такая как нарсоплимаб. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, инфицированного COVID-19, проявляются симптомы COVID-19. В некоторых вариантах осуществления субъект, инфицированный COVID-19, является бессимптомным. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее был инфицирован COVID-19 и страдает или подвергается риску развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня комплекса C1s/C1-INH в исследуемом образце, где повышенный уровень комплекса C1s/C1-INH (т.е. по меньшей мере в 2 раза или больше) по сравнению со здоровыми контролями указывает на повышенную вероятность выздоровления после COVID-19, а низкий уровень C1s/C1-INH свидетельствует о повышенной вероятности неблагоприятного исхода.

В другом аспекте настоящее изобретение предложен способ контроля эффективности лечения MASP-2-ингибирующим антителом у субъекта-млекопитающего, страдающего одним или более осложнениями, связанными с COVID-19, где способ включает: (a) введение дозы MASP-2-ингибирующего антитела субъекту-млекопитающему в первый момент времени; (b) оценку первой концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (a); (c) лечение субъекта MASP-2-ингибирующим антителом во второй момент времени; (d) оценку второй концентрации комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (c); и (e) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, определенного на этапе (b), с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH, определенным на этапе (d), с целью определения эффективности MASP-2-ингибирующего антитела у субъекта-млекопитающего.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта-млекопитающего, страдающего или подвергающегося риску развития заболевания или нарушения, связанного с COVID-19, включающий введение субъекту MASP-2-ингибирующего антитела, если установлено, что субъект имеет: (i) более высокое количество комплекса MASP-2/C1-INH в одном или больше биологических образцах, взятых у субъекта, по сравнению с заданным уровнем комплекса MASP-2/C1-INH или по сравнению с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH в одном или больше контрольных образцах.

VII. Иллюстративные варианты осуществления

A. MASP-2-специфичное мАт, которое связывается с MASP-2 в комплексе с C1-INH (с комплексом MASP-2/C1-INH)

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где антитело включает связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98,

где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

2. Моноклональное антитело согласно параграфу 1, где указанное антитело включает: (a) вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:87, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:98.

3. Моноклональное антитело согласно параграфу 1, где указанное антитело является гуманизированным, химерным или полностью человеческим антителом.

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

5. Моноклональное антитело согласно любому из параграфов 1-4, где указанное антитело представляет собой одноцепочечную молекулу.

6. Моноклональное антитело согласно любому из параграфов 1-4, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из параграфов 1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с MASP-2 человека с Kd меньше 10 нМ.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из параграфов 1-7, где указанное антитело помечено детектируемой молекулой.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из параграфов 1-8, где указанное антитело или его фрагмент иммобилизованы на подложке.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с MASP-2 человека, как указано в любом из параграфов 1-7.

11. Кассета экспрессии, включающая молекулу нуклеиновой кислоты,

кодирующую антитело или его фрагмент, которые специфично связывают MASP-2 человека согласно изобретению в соответствии с параграфом 10.

12. Клетка, включающая по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, которые специфично связывают MASP-2 человека согласно изобретению в соответствии с параграфом 10 или параграфом 11.

13. Композиция, включающая антитело или его фрагмент, которые специфично связывают MASP-2 человека, как указано в любом из параграфов 1-9.

14. Субстрат для применения в иммуноанализе, включающий по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, которые специфично связывают MASP-2 человека, как указано в любом из параграфов 1-9.

15. Набор для определения присутствия или количества комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, включающий: (a) по меньшей мере один контейнер и (b) по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, которые специфично связывают MASP-2 человека, как указано в любом из параграфов 1-9.

16. Набор согласно параграфу 15, дополнительно включающий по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, которые специфично детектируют C1-INH в комплексе с MASP-2.

17. Набор согласно параграфу 15 или 16, где антитело, которое специфично связывается с MASP-2, иммобилизовано на подложке (например, на грануле).

18. Набор согласно параграфу 16, где антитело, которое специфично связывается с C1-INH, помечено детектируемой молекулой.

19. Набор согласно любому из параграфов 15-18, где набор предназначен для применения в иммуноанализе.

20. Набор согласно параграфу 19, где иммуноанализ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) или анализ на основе гранул.

21. Набор согласно параграфу 19 или 20, где антитело или его фрагмент, которые связываются с MASP-2, представляют собой покрывающее/захватывающее антитело.

22. Набор согласно параграфу 19 или 20, где антитело или его фрагмент, которые связываются с C1-INH, представляют собой детектирующее антитело.

23. Набор согласно любому из параграфов 15-22, где набор дополнительно включает референсный стандарт, соответствующий уровню комплекса MASP-2/C1-INH у здорового контрольного субъекта или группы здоровых субъектов-людей.

24. Набор согласно любому из параграфов 15-23, где набор дополнительно включает референсный стандарт, соответствующий уровню комплекса MASP-2/C1-INH у субъекта, страдающего тяжелым COVID-19, или группы субъектов, страдающих тяжелым COVID-19, или количество рекомбинантного комплекса MASP-2/C1-INH, соответствующее субъекту, страдающему тяжелым COVID-19.

25. Набор согласно любому из параграфов 15-24, где набор дополнительно включает антитело или его фрагмент, которые связываются с C1s в комплексе с C1-INH.

26. Набор согласно параграфу 25, где антитело, которое связывается с C1s,

представляет собой захватывающее антитело.

27. Набор согласно параграфу 25 или 26, где антитело, которое специфично связывается с C1s-INH, иммобилизовано на подложке (например, на грануле).

B. Способы определения количества комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце

1. Способ измерения количества MASP-2/C1-INH в биологическом образце, включающий:

(a) получение исследуемого биологического образца у субъекта-человека;

(b) проведение иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, где MASP-2/C1-INH захватывается моноклональным антителом, которое специфично связывается с MASP-2 человека; и комплекс MASP-2/C1-INH детектируют напрямую или ненапрямую с использованием антитела, которое специфично связывается с C1-INH; и

(c) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженного в соответствии с (b), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH, определенный в исследуемом образце, указывает на степень активации комплемента по лектиновому пути.

2. Способ согласно параграфу 1, где биологический образец представляет собой образец жидкости, выбранной из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мочи и спинномозговой жидкости.

3. Способ согласно параграфу 1 или 2, где антитело, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

4. Способ согласно параграфу 1 или 2, где биологический образец представляет собой образец сыворотки крови в концентрации от 0,3 до 5%.

5. Способ согласно любому из параграфов 1-4, где субъект-человек в настоящее время инфицирован SARS-CoV-2 или был ранее инфицирован SARS-CoV-2, или где субъект страдает или подвергается риску развития другого заболевания или нарушения лектинового пути (например, COVID-19, ТГСК-ТМА, IgAN, GvHD).

6. Способ согласно параграфу 5, где способ дополнительно включает определение, что субъект страдает или подвергается риску развития тяжелого COVID-19 или долгого COVID-19, на основе определения того, что обнаруженный уровень комплекса MASP-2/C1-INH выше (по меньшей мере на 20% выше, например, по меньшей мере на 30% выше или по меньшей мере на 40% выше, или по меньшей мере на 50% выше, или по меньшей

мере на 60% выше, или по меньшей мере на 70% выше, или по меньшей мере на 80% выше, или по меньшей мере на 90% выше, или в 2 раза выше), чем заданный уровень или контрольное референсное значение у здоровых субъектов.

7. Способ согласно любому из параграфов 1-6, где у субъекта определен уровень комплекса MASP-2/C1-INH выше нормального, и его идентифицируют как кандидата на лечение средством, ингибирующим комплемент.

8. Способ согласно любому из параграфов 1-7, где способ дополнительно включает введение ингибитора комплемента субъекту, у которого установлено, что уровень комплекса MASP-2/C1-INH превышает нормальный уровень.

9. Способ согласно параграфу 8, где ингибитор комплемента представляет собой MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб, или низкомолекулярный ингибитор MASP-2).

10. Способ согласно любому из параграфов 1-4, где субъект-млекопитающее прошел лечение средством, ингибирующим комплемент, таким как средство, ингибирующее лектиновый путь комплемента, такое как MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб).

11. Способ согласно параграфу 10, где контрольный образец представляет собой образец, взятый у субъекта до лечения MASP-2-ингибирующим средством, или образец, взятый в более ранний момент времени во время курса лечения MASP-2-ингибирующим средством.

12. Способ согласно любому из параграфов 10 или 11, где MASP-2-ингибирующее средство, представляет собой MASP-2-ингибирующее антитело.

C. Способы определения риска развития у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода острого COVID-19, или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19

1. Способ определения риска развития у субъекта, который инфицирован или был инфицирован SARS-CoV-2, ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода острого COVID-19, или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, включающий:

(a) получение биологического образца у субъекта;

(b) измерение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в образце;

(c) сравнение измеренного уровня с заданным уровнем комплекса MASP-2/C1-INH или референсным стандартом для оценки риска развития ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода острого COVID-19, и/или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19; и

(d) определение риска развития у субъекта ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода острого COVID-19, и/или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, и предоставление результатов пациенту, врачу или в базу данных;

(e) необязательно, назначение лечения субъекту, у которого определена высокая вероятность развития острого заболевания и/или другого неблагоприятного исхода

острого COVID-19, и/или долгосрочных последствий, связанных с инфекцией COVID-19.

2. Способ согласно параграфу 1, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH измеряют в иммуноанализе.

3. Способ согласно параграфу 3, включающий проведение иммуноанализа для измерения уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце.

4. Способ согласно параграфу 2 или параграфу 3, где иммуноанализ представляет собой анализ ИФА или анализ на основе гранул.

5. Способ согласно параграфу 4, где иммуноанализ включает применение захватывающего антитела, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

6. Способ согласно любому из параграфов 1-5, дополнительно включающий анализ или иное определение уровня комплекса C1s/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта.

D. Способы лечения, подавления, облегчения или профилактики острого COVID-19 у млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2 и подверженного риску развития острого COVID-19

1. Способ лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома, пневмонии или некоторых других легочных или других острых проявлений COVID-19, таких как тромбоз, у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2 и подверженного риску развития острого COVID-19, включающий:

(i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с контрольным образцом здорового субъекта указывает на повышенный риск развития одного или больше острых проявлений COVID-19; и

(ii) введение субъекту, имеющему повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH, количества ингибитора MASP-2, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

2. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой антитело к MASP-2 или его фрагмент.

3. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6.

4. Способ согласно параграфу 2, где антитело MASP-2 или его фрагмент

специфично связываются с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью по меньшей мере в 10 раз большей, чем при связывании с другим антигеном в системе комплемента.

5. Способ согласно параграфу 2, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

6. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство селективно ингибирует активацию комплемента по лектиновому пути по существу без ингибирования C1q-зависимой активации комплемента.

7. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой низкомолекулярное MASP-2-ингибирующее соединение.

8. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2.

9. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69.

10. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO:69.

11. Способ согласно параграфу 1, где стадия (i) включает применение антитела, набора или композиции в соответствии с любым из параграфов A1-A24.

12. Способ согласно параграфу 1, где этап (i) включает способ согласно любому из параграфов B1-B11.

13. Способ согласно параграфу 1, где стадия (i) включает способ согласно любому из параграфов C1-C5.

E. Способы лечения, подавления, облегчения или профилактики долгого COVID-19 у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2 и подверженного риску развития долгого COVID-19

1. Способ лечения, уменьшения тяжести, предотвращения или снижения риска развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2, включающий:

(i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с контрольным образцом здорового субъекта указывает на повышенный риск развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19; и

(ii) введение субъекту, имеющему повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-

INH, количества ингибитора MASP-2, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

2. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой антитело к MASP-2 или его фрагмент.

3. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6.

4. Способ согласно параграфу 2, где антитело к MASP-2 или его фрагмент специфично связываются с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью по меньшей мере в 10 раз большей, чем при связывании с другим антигеном в системе комплемента.

5. Способ согласно параграфу 2, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

6. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее средство селективно ингибирует активацию комплемента лектинового пути по существу без ингибирования C1q-зависимой активации комплемента.

7. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой низкомолекулярное MASP-2-ингибирующее соединение.

8. Способ согласно параграфу 1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2.

9. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69.

10. Способ согласно параграфу 2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO:69.

11. Способ согласно параграфу 1, где одно или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, выбрано из группы, состоящей из сердечно-сосудистых осложнений (включая повреждение миокарда, кардиомиопатию, миокардит, внутрисосудистое свертывание крови, инсульт, венозные и артериальные осложнения и легочный тромбоз); неврологического осложнения (включая когнитивные затруднения, спутанность сознания, потерю памяти, также называемую "затуманенным сознанием", головную боль, инсульт, головокружение, обмороки, судороги, анорексию, бессонницу, аносмию, агевзию, миоклонус, нейропатическую боль, миалгии, развитие неврологического заболевания, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Гийена-Барре,

синдром Миллера-Фишера, болезнь Паркинсона), повреждения почек (например, острой почечной недостаточности (ОПН); легочного осложнения (включая фиброз легких, одышку, легочную эмболию), воспалительного состояния, такого как синдром Кавасаки, Кавасаки-подобный синдром, мультисистемный воспалительный синдром у детей, полиорганная недостаточность, крайняя утомляемость, мышечная слабость, субфебрильная температура, невозможность концентрации внимания, провалы в памяти, изменения настроения, нарушения сна, покалывание в руках и ногах, диарея и рвота, потеря вкуса и обоняния, боль в горле и затрудненное глотание, первичное возникновение диабета и гипертензии, кожная сыпь, одышка, боли в груди и учащенное сердцебиение.

12. Способ согласно параграфу 1, где стадия (i) включает применение антитела, набора или композиции в соответствии с любым из параграфов A1-A24.

13. Способ согласно параграфу 1, где этап (i) включает способ по любому из пунктов B1-B11.

14. Способ согласно параграфу 1, где стадия (i) включает способ по любому из пунктов C1-C5.

F. Способы мониторинга эффективности лечения MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом у млекопитающего, нуждающегося в этом

1. Способ мониторинга эффективности лечения MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий:

(a) введение дозы MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту-млекопитающему в первый момент времени;

(b) оценку первого уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (a);

(c) лечение субъекта MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом во второй момент времени;

(d) оценку второго уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (c); и

(e) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, определенного на этапе (b), с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH, определенного на этапе (d), с целью определения эффективности MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта-млекопитающего.

2. Способ согласно параграфу 1, дополнительно включающий коррекцию дозы MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

3. Способ согласно параграфу 2, где дозу MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимого субъекту, увеличивают, если уровень комплекса MASP-2/C1-INH выше контрольного или референсного стандарта.

4. Способ согласно параграфу 3, где в случае, если субъекту вводят повышенную дозу MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, этапы

(b)-(e) повторяют для определения, является ли повышенная доза достаточной для доведения уровня комплекса MASP-2/C1-INH до нужного уровня по сравнению с соответствующим контролем или референсным стандартом.

5. Способ согласно параграфу 1, где этапы (b) и (d) включают оценку концентрации комплекса MASP-2/CI-INH в биологических образцах с помощью иммуноанализа.

6. Способ согласно параграфу 5, где иммуноанализ представляет собой иммунофлуоресцентный анализ на основе гранул.

7. Способ согласно параграфу 6, где иммуноанализ включает применение захватывающего антитела, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

8. Способ согласно параграфу 6 или 7, где биологический образец представляет собой сыворотку или плазму крови.

9. Способ согласно параграфу 8, где биологический образец представляет собой от 1% до 5% сыворотки или плазмы крови.

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

11. Способ согласно параграфу 10, где субъект-человек страдает или подвергается риску развития заболевания или нарушения лектинового пути, выбранного из группы, состоящей из ТГСК-ТМА, IgAN, волчаночного нефрита и реакции трансплантат против хозяина или некоторых других заболеваний или нарушений лектинового пути.

12. Способ согласно параграфу 1, где субъект-человек страдает COVID-19 или подвергается риску его развития или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19.

13. Способ согласно параграфу 1, где второй момент времени наступает через 2-14 дней после первого момента времени.

14. Способ согласно параграфу 1, где второй момент времени наступает в пределах от 2 до 7 дней после первого момента времени.

15. Способ согласно параграфу 1, где второй момент времени наступает в пределах от 2 до 4 дней после первого момента времени.

VI. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры просто иллюстрируют лучший вариант, рассматриваемый в настоящее время для практической реализации изобретения, однако их не следует рассматривать как ограничивающие данное изобретение. Все цитируемые в настоящем документе источники в явной форме включены посредством отсылки.

ПРИМЕР 1

В данном примере описано создание линии мышей, дефицитных по MASP-2 (MASP-2-/-), но достаточных по Map19 (Map19+/+).

Материалы и методы: Был сконструирован направляющий вектор pKO-NTKV

1901 для прерывания трех экзонов, кодирующих С-концевую область MASP-2 мыши, включая экзон, который кодирует домен сериновой протеазы, как показано на **ФИГУРЕ 3**. PKO-NTKV 1901 использовали для трансфекции линии мышиных ES клеток E14.1a (SV129 O1a). Отбирали устойчивые к неомицину и чувствительные к тимидинкиназе клоны. Скринировали 600 ES-клонов, и из них отобрали четыре разных клона и подтверждали с помощью Саузерн-блоттинга на содержание ожидаемого селективного направленного и рекомбинантого события, как показано на ФИГУРЕ 3. Химеры создавали на основе этих четырех положительных клонов путем переноса эмбрионов. Затем химеры обратно скрещивали с генетическим фоном C57/BL6 с получением трансгенных самцов. Трансгенных самцов скрещивали с самками с получением животных F1 с 50% гетерозиготного потомства по прерванному гену MASP-2. Гетерозиготных мышей перекрестно скрещивали с получением гомозиготного MASP-2 дефицитного потомства, получив в результате гетерозиготных мышей и мышей дикого типа в соотношении 1:2:1, соответственно.

Результаты и фенотип: Полученные гомозиготные MASP-2-/- дефицитные мыши оказались жизнеспособными и фертильными, и были проверены на MASP-2-дефицит с помощью Саузерн-блоттинга для подтверждения правильного направленного события, с помощью Нозерн-блоттинга для подтверждения отсутствия мРНК MASP-2 и с помощью Вестерн-блоттинга для подтверждения отсутствие белка MASP-2 (данные не показаны). Присутствие мРНК MAp19 и отсутствие мРНК MASP-2 также подтверждали с помощью ОТ-ПЦР с временным разрешением на приборе LightCycler. Мыши MASP-2-/- продолжали экспрессировать мРНК и белок Map19, MASP-1 и MASP-3, как и ожидалось (данные не показаны). Присутствие и представленность у MASP-2-/- мышей мРНК пропердина, Фактора B, Фактора D, C4, C2 и C3 оценивали с помощью анализа LightCycler, которых показал идентичность по таким показателям с однопометными контрольными животными дикого типа (данные не показаны). Плазма гомозиготных MASP-2-/- мышей совершенно не показала присутствия опосредованной лектиновым путем активации комплемента, как далее описано в Примере 2.

Создание MASP-2-/- линии на чистом фоне C57BL6: мышей MASP-2-/- обратно скрещивали с чистой линией C57BL6 в течение девяти поколений до применения MASP-2-/- линии в качестве экспериментальной модели на животных.

Линию трансгенных мышей, которая представляет собой MASP-2 -/-, Map19+/+ мышей и которая экспрессирует человеческий MASP-2 трансген (нокаут мышиного MASP-2 и нокин человеческого MASP-2), также создавали следующим образом:

Материалы и методы: Сконструировали миниген, кодирующий MASP-2 человека, названный "мини hMASP-2" (SEQ ID NO:49), как показано на ФИГУРЕ 4, который включает промоторную область гена MASP 2 человека, включая первые 3 экзона (экзон 1 - экзон 3), после которых следует последовательность кДНК, которая представляет собой кодирующую последовательность следующих 8 экзонов, и, таким образом, кодирующий полноразмерный белок MASP 2 под контролем своего эндогенного

промотора. Конструкцию мини hMASP-2 вводили в оплодотворенные яйца MASP-2-/- для замены дефицитного мышиного гена MASP 2 трансгенно экспрессируемым человеческим MASP-2.

ПРИМЕР 2

Даный пример демонстрирует, что MASP-2 требуется для активации комплемента по лектиновому пути.

Материалы и методы:

Анализ специфического для лектинового пути расщепления C4: Анализ расщепления C4 был описан Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001), которые измеряли активацию лектинового пути в результате воздействия липотехоевой кислоты (LTA) из S. aureus, которая связывает L-фиколин. Анализ, описанный Petersen et al., (2001), адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством МСЛ путем покрытия планшета ЛПС и маннаном или зимозаном перед добавлением сыворотки MASP-2-/- мышей, как описано ниже. Анализ также модифицировали для исключения возможности расщепления C4 по классическому пути. Это было достигнуто при использовании буфера для разведения образцов, содержащего 1M NaCl, что обеспечивает высокоаффинное связывание распознающих компонентов лектинового пути со своими лигандами, но при этом предотвращает активацию эндогенного C4, исключая участие классического пути при диссоциации комплекса C1. Вкратце, в модифицированном анализе образцы сыворотки (разведенные в буфере с высокой концентрацией соли (1 M NaCl)) добавляли в покрытые лигандом планшеты с последующим добавлением постоянного количества очищенного C4 в буфере с физиологической концентрацией соли. Связывающие распознающие комплексы, содержащие MASP-2, расщепляют C4, что приводит к отложению C4b.

Методы анализа:

1) Микротитрационные планшеты NuncMaxisorb (Maxisorb®, Nunc, номер по кат. 442404, Fisher Scientific) покрывали 1 мкг/мл маннана (M7504 Sigma) или любым другим лигандом (например, таким как лиганды, перечисленные ниже), разведенным в покрывающем буфере (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

В анализе использовали следующие реагенты:

a. маннан (1 мкг/лунка маннана (M750 Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);

b. зимозан (1 мкг/лунка зимозана (Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);

c. LTA (1 мкг/лунка в 100 мкл покрывающего буфера или 2 мкг/лунка в 20 мкл метанола)

d. 1 мкг H-фиколин-специфичного мАт 4H5 в покрывающем буфере

e. PSA из Aerococcus viridans (2 мкг/лунка в 100 мкл покрывающего буфера)

f. 100 мкл/лунка фиксированного в формалине S. aureus DSM20233 (OD550=0,5) в покрывающем буфере.

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

3) После инкубирования в течение ночи, оставшиеся сайты связывания белка

насыщали при инкубировании планшетов с 0,1% HSA-TBS блокирующим буфером (0,1% (в/об) HSA в 10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 1,5 мМ NaN_3, pH 7,4) в течение 1-3 часов, затем планшеты 3× промывали TBS/tween/Ca^{2+} (TBS с 0,05% Tween 20 и 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4).

4) Образцы сыворотки для исследования разводили в МСЛ-связывающем буфере (1 М NaCl), добавляли разведенные образцы в планшеты и оставляли для инкубирования на ночь при 4°C. Лунки, содержащие только буфер, использовали в качестве отрицательного контроля.

5) После инкубирования в течение ночи при 4°C, планшеты 3 раза промывали TBS/tween/Ca^{2+}. Затем в планшеты добавляли человеческий C4 (100 мкл/лунка 1 мкг/мл, разведенный в BBS (4 мМ барбитал, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4)) и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Планшеты снова 3 раза промывали TBS/tween/Ca^{2+}.

6) Отложение C4b детектировали с помощью конъюгированного с щелочной фосфатазой куриного антитела против C4c человека (в соотношении 1:1000 в TBS/teen/Ca^{2+}), которое добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре. Затем планшеты снова 3 раза промывали TBS/tween/Ca^{2+}.

7) Щелочную фосфатазу детектировали при добавлении 100 мкл раствора субстрата, п-нитрофенилфосфата, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут и считывали OD_{405} в спектрофотометре для микротитрационных планшетов.

Результаты: На ФИГУРАХ 5A-B показано количество отложения C4b на маннане (ФИГУРА 5) и зимозане (ФИГУРА 5B) в разведениях сыворотки MASP-2+/+ (крестики), MASP-2+/- (закрашенные кружки) и MASP-2-/- (закрашенные треугольники). На ФИГУРЕ 5C показана относительная активность C4-конвертазы на планшетах, покрытых зимозаном (белые столбцы) или маннаном (темные столбцы) мышей MASP-2-/+ (n=5) и мышей MASP-2-/- (n=4) в сравнении с мышами дикого типа (n=5), на основе количественного определения отложения C4b, нормированного относительно сыворотки дикого типа. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Как показано на ФИГУРЕ 5A-C, плазма мышей MASP-2-/- является полностью дефицитной по опосредованной лектиновым путем активации комплемента на покрытых маннаном и зимозаном планшетах. Эти результаты четко демонстрируют, что MASP-2 является эффекторным компонентом лектинового пути.

Рекомбинантный MASP-2 восстанавливает зависимую от лектинового пути активацию C4 в сыворотке MASP-2-/- мышей

Чтобы установить, что отсутствие MASP-2 является непосредственной причиной потери зависимой от лектинового пути активации C4 у MASP-2-/- мышей, проверяли эффект добавления рекомбинантного белка MASP-2 к образцам сыворотки в анализе расщепления C4, описанном выше. Рекомбинантные белки функционально активного мышиного MASP-2 и каталитически неактивного мышиного MASP-2A (в котором остаток серина в активном центре в домене сериновой протеазы был заменен остатком аланина)

получали и очищали, как описано ниже в Примере 3. Смешанную сыворотку 4 мышей MASP-2-/- предварительно инкубировали с повышаемыми концентрациями белков рекомбинантного мышиного MASP-2 или неактивного рекомбинантного мышиного MASP-2A и анализировали активность C4-конвертазы, как описано выше.

Результаты: Как показано на ФИГУРЕ 6, добавление функционально активного мышиного рекомбинантного белка MASP-2 (показанного незакрашенными треугольниками) к сыворотке, полученной у мышей MASP-2-/-, восстанавливало зависимую от лектинового пути активацию C4 в зависимости от концентрации белка, тогда как каталитически неактивный мышиный белок MASP-2A (показан звездочками) не восстанавливал активацию C4. Результаты, показанные на ФИГУРЕ 6, нормализованы по активации C4, наблюдаемой со смешанной сывороткой мышей дикого типа (показана пунктирной линией).

ПРИМЕР 3

В данном примере описана рекомбинантная экспрессии и продукция белка рекомбинантных полноразмерных MASP-2 человека, крысы и мыши, MASP-2-производных полипептидов и каталитически инактивированных мутантных форм MASP-2.

Экспрессия полноразмерных MASP-2 человека, крысы и мыши:

Полноразмерную последовательность кДНК MASP-2 человека (SEQ ID NO:4) также субклонировали в экспрессионный вектор млекопитающих pCI-Neo (Promega), который направляет эукариотическую экспрессию под контролем энхансерной/промоторной области ЦМВ (описано в публикации Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 9:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Emymology, 185:537-66 (1991)). Каждую полноразмерную кДНК MASP-2 мыши (SEQ ID NO:50) и крысы (SEQ ID NO:53) субклонировали в вектор экспрессии pED. Векторы экспрессии с MASP-2 затем трансфицировали в линию адгерентных клеток яичников китайского хомячка DXB1 при использовании стандартной методики трансфекции с фосфатом кальция, описанной в Maniatis et al., 1989. Клетки, трансфицированные этими конструкциями, росли очень медленно, что указывало на то, что кодируемая протеаза является цитотоксичной.

В другом подходе конструкцию минигена (SEQ ID NO:49), содержащую кДНК MASP-2 человека под контролем собственного эндогенного промотора, транзиентно трансфицировали в клетки яичников китайского хомячка (CHO). Белок MASP-2 человека секретировали в среду культивирования и выделяли, как описано ниже.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2:

Обоснование: MASP-2 активируется аутокаталитическим расщеплением после распознавания субкомпонентов МСЛ или фиколинов (L-фиколина, H-фиколина или M-фиколина), связанных с их соответствующим углеводным паттерном. Аутокаталитическое расщепление, приводящее к активации MASP-2, часто проходит во время процедуры выделения MASP-2 из сыворотки крови, или при очистке после рекомбинантной экспрессии. Для получения более стабильного белкового препарата для использования в

качестве антигена, каталитически неактивную форму MASP-2, обозначенную MASP-2A, создали путем замены остатка серина, который присутствует в каталитической триаде протеазного домена, остатком аланина в MASP-2 крысы (SEQ ID NO:55 Ser617→Ala617); мыши (SEQ ID NO:52 Ser617→Ala617); или человека (SEQ ID NO:6 Ser618→Ala618).

Для создания каталитически неактивных человеческих и мышиных белков MASP-2A проводили сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов, показанных в ТАБЛИЦЕ 5. Олигонуклеотиды в ТАБЛИЦЕ 5 были созданы для отжига с областью кДНК человека и мыши, кодирующей ферментативно активный серин, и олигонуклеотид содержал некомплементарное основание для замены кодона серина на кодон аланина. Например, ПЦР-олигонуклеотиды SEQ ID NO:56-59 использовали в комбинации с кДНК MASP-2 человека (SEQ ID NO:4) для амплификации области от старт-кодона до ферментативно активного серина и от серина до стоп-кодона, с получением полной открытой рамки считывания мутантного MASP-2A, содержащего мутацию с заменом Ser618 на Ala618. ПЦР-продукты очищали после электрофореза в агарозном геле и выделения соответствующей полосы, и вводили одиночные выступающие аденозины с помощью стандартной методики тейлинга. Затем MASP-2A с концевым аденозином клонировали в вектор pGEM-T easy, трансформированный в E. coli.

Каталитически неактивный белок MASP-2A крысы создавали при обработке киназой и отжига SEQ ID NO:64 и SEQ ID NO:65 путем объединения этих двух олигонуклеотидов в эквимолярных количествах, нагревания при 100°C в течение 2 минут и медленного охлаждения до комнатной температуры. Полученный в результате отожженный фрагмент имеет PstI- и XbaI-совместимые концы и был встроен вместо PstI-XbaI фрагмента кДНК крысиного MASP-2 дикого типа (SEQ ID NO:53) с получением крысиного MASP-2A.

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

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

Каждый из MASP-2A человека, мыши и крысы затем субклонировали в один из векторов pED или pCI-Neo для экспрессии в клетках млекопитающих и трансфицировали в линию клеток яичников китайского хомячка DXB1, как описано ниже.

В другом подходе каталитически неактивную форму MASP-2 конструировали с использованием способа, описанного в Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001. Вкратце, плазмиду, содержащую полноразмерную кДНК MASP-2 человека (описанную в Thiel et al., Nature 386:506, 1997), расщепляли XhoI и EcoRI, и клонировали кДНК MASP-2 (описанную в настоящем документе как SEQ ID NO:4) по соответствующим сайтам рестрикции в бакуловирусный трансферный вектор pFastBac1 (Life Technologies, NY). Затем Ser618 в активном центре сериновой протеазы MASP-2 меняли на Ala618 путем замены двуцепочечных олигонуклеотидов, кодирующих аминокислоты 610-625 (SEQ ID NO:13) пептидной области, аминокислотами 610-625 нативной области, с получением полноразмерного полипептида MASP-2 с неактивным протеазным доменом.

Конструирование экспрессионных плазмид, содержащих полипептидные области, происходящие из MASP-2 человека

Следующие конструкции получали с использованием сигнального пептида MASP-2 (остатки 1-15 SEQ ID NO:5) для секретирования различных доменов MASP-2. Конструкцию, экспрессирующую домен CUBI MASP-2 человека (SEQ ID NO:8), получали с помощью ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-121 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (соответствующие N-концевому домену CUBI). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGF MASP-2 человека (SEQ ID NO:9), получали с помощью ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-166 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (соответствующие N-концевому домену CUBIEGF). Конструкцию, экспрессирующую домен CUBIEGFCUBII MASP-2 человека (SEQ ID NO:10), получали с помощью ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-293 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (соответствующие N-концевому домену CUBIEGFCUBII). Вышеуказанные домены амплифицировали с помощью ПЦР при использовании полимеразы $Vent_R$ и pBS-MASP-2 в качестве матрицы, в соответствии с общепринятыми методами ПЦР. 5'-праймерная последовательность смыслового праймера (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34) вводит сайт рестрикции BamHI (подчеркнут) на 5'-конец ПЦР-продуктов. Антисмысловые праймеры для каждого из доменов MASP-2, показанные ниже в ТАБЛИЦЕ 5, предназначены для введения стоп-кодона (выделенного жирным шрифтом), после которого следует сайт EcoRI (подчеркнут) на конце каждого ПЦР-продукта. После амплификации фрагменты ДНК расщепляли по BamHI и EcoRI и клонировали по соответствующим сайтам в вектор pFastBac1. Полученные конструкции характеризовали с помощью рестрикционного картирования и подтверждали дцДНК-секвенированием.

ТАБЛИЦА 5: ПЦР-ПРАЙМЕРЫ К MASP-2

Домен MASP-2	**5' ПЦР-праймер**	**3' ПЦР-праймер**
SEQ ID NO:8 CUBI (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGB 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 MASP-2 человека	5'ATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2 вперед	5'TTAAAATCACTAATTATGTTCTCGATC 3' (ID SEQ Номер: 59) hMASP-2_reverse
SEQ ID NO:4 кДНК MASP-2 человека	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO:58) hMASP-2_ala_forward	5'GTGCCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_reverse

SEQ ID NO:50 кДНК MASP-2 мыши	5'ATGAGGCTACTCATCTT CCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_forward	5'TTAGAAATTACTTATTA TGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_reverse
SEQ ID NO:50 кДНК MASP-2 мыши	5'CCCCCCCTGCGTCACCT CTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_Ala_forward	5'CTGCAGAGGTGACGCA GGGGGGG3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_reverse

Рекомбинантная эукариотическая экспрессия MASP-2 и продукция белка ферментативно неактивного мышиного, крысиного и человеческого MASP-2A.

Экспрессионные конструкции MASP-2 и MASP-2A, описанные выше, трансфицировали в клетки DXB1 с использованием стандартной методики трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной среде, чтобы гарантировать, что препараты не были контаминированы другими сывороточными белками. Среды собирали с конфлюентных клеток каждые два дня (в общей сложности четыре раза). Средний уровень рекомбинантного MASP-2 составил приблизительно 1,5 мг/литр среды культивирования для каждого из трех видов.

Очистка белка MASP-2A: MASP-2A (Ser-Ala мутант, описанный выше) очищали с помощью аффинной хроматографии на колонках с MBP-A-агарозой. Эта стратегия позволяла проводить быструю очистку без использования чужеродных меток. MASP-2A (100-200 мл среды, разбавленной равным объемом буфера для нанесения (50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, содержащего 150 мМ NaCl и 25 мМ $CaCl_2$)) наносили на аффинную колонку с MBP-агарозой (4 мл), предварительно уравновешенную 10 мл буфера для нанесения. После промывки дополнительными 10 мл буфера для нанесения, белки элюировали фракциями по 1 мл в 50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, содержащего 1,25 М NaCl и 10 мМ ЭДТА. Фракции, содержащие MASP-2A, идентифицировали с помощью электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле. При необходимости, MASP-2A дополнительно очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (HR 5/5). Белок диализировали против 50 мМ Tris-Cl pH 7,5, содержащего 50 мМ NaCl, и наносили на колонку, уравновешенную тем же буфером. После промывки связанный MASP-2A элюировали в градиенте 0,05-1 М NaCl в 10 мл.

Результаты: Выходы 0,25-0,5 мг белка MASP-2A были получены из 200 мл среды. Молекулярная масса 77,5 кДа, определенная с помощью МАЛДИ-МС, превышает вычисленное значение немодифицированного полипептида (73,5 кДа) вследствие гликозилирования. Присоединение гликанов к каждому из сайтов N-гликозилирования определяет наблюдаемую массу. MASP-2A мигрирует отдельной полосой в SDS-полиакриламидном геле, демонстрируя, что он не подвергся протеолизу в процессе биосинтеза. Средневесовая молекулярная масса, определенная с помощью равновесного ультрацентрифугирования, соответствует вычисленному значению для гомодимеров гликозилированных полипептидов.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ MASP-2 ЧЕЛОВЕКА

Еще один способ получения рекомбинантных MASP-2 и MASP2A производных полипептидов описан в Thieiens, H.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Вкратце,

клетки насекомого Spadoptera frugiperda (клетки Ready-Plaque Sf9, полученные в Novagen, Madison, WI) выращивали и поддерживали в бессывороточной среде Sf900II (Life Technologies) с добавкой 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Клетки насекомого Trichoplusia ni (High Five) (предоставленные Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) поддерживали в среде TC100 (Life Technologies), содержащей 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France) с добавкой 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Рекомбинантные бакуловирусы создавали с использованием системы Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмидную ДНК очищали с помощью системы очистки Qiagen midiprep (Qiagen) и использовали для трансфекции клеток насекомого Sf9 с использованием целфектина в среде Sf900 II SFM (Life Technologies), как описано в инструкции производителя. Рекомбинантные вирусные частицы собирали через 4 дня, титровали с помощью теста бляшкообразования вируса, и амплифицировали, как описано в King and Possee, в The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, стр. 111-114, 1992.

Клетки High Five ($1,75\times10^7$ клеток/175 $см^2$-флакон для культуры тканей) инфицировали рекомбинантными вирусами, содержащими полипептиды MASP-2, при множественности заражения 2 в среде Sf900 II SFM при 28°C в течение 96 ч. Супернатанты собирали с помощью центрифугирования и добавляли диизопропилфторфосфат до конечной концентрации 1 мМ.

Полипептиды MASP-2 секретируются в культуральную среду. Супернатанты культур диализировали против 50 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триэтаноламингидрохлорида, pH 8,1, и наносили при 1,5 мл/мин на колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), уравновешенную в том же буфере. Элюирование проводили путем применения линейного градиента 1,2 л до 350 мМ NaCl в том же буфере. Фракции, содержащие рекомбинантные полипептиды MASP-2, идентифицировали с помощью Вестерн-блоттинга, осаждали добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до 60% (в/об) и оставляли на ночь при 4°C. Осадок ресуспендировали в 145 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триэтаноламингидрохлорида, pH 7,4, и наносили на колонку TSG3000 SWG (7,5×600 мм) (Tosohaas, Montgomeryville, PA), уравновешенную в том же буфере. Затем очищенные полипептиды концентрировали до 0,3 мг/мл с помощью ультрафильтрации на микроконцентраторах Microsep (отсечение по мол. массе=10000) (Filtron, Karistein, Germany).

ПРИМЕР 4

В данном примере описан способ получения поликлональных антител против полипептидов MASP-2.

Материалы и методы:

Антигены MASP-2: Поликлональную антисыворотку против MASP-2 человека получали путем иммунизации кроликов следующими выделенными полипептидами MASP-2: MASP-2 человека (SEQ ID NO:6), выделенный из сыворотки крови;

рекомбинантный MASP-2 человека (SEQ ID NO:6), MASP-2A, содержащий неактивный протеазный домен (SEQ ID NO:13), как описано в Примере 3; и рекомбинантные CUBI (SEQ ID NO:8), CUBEGFT (SEQ ID NO:9) и CUBEGFCUBII (SEQ ID NO:10), экспрессированные, как описано выше в Примере 3.

Поликлональные антитела: Шестинедельных кроликов, примированных БЦЖ (вакциной на основе бациллы Кальметта-Герена), иммунизировали путем инъекции 100 мкг полипептида MASP-2 в 100 мкг/мл стерильного физиологического раствора. Инъекции делали каждые 4 недели, титр антител при этом контролировали с помощью ИФА, как описано в Примере 5. Культуральные супернатанты собирали для очистки антител с помощью аффинной хроматографии с белком А.

ПРИМЕР 5

В данном примере описан способ получения мышиных моноклональных антител против полипептидов MASP-2 крысы и человека.

Материалы и методы:

Самцам мышей A/j (Harlan, Houston, Tex.) возрастом 8-12 недель подкожно вводили по 100 мкг полипептидов rMASP-2 или rMASP-2A человека или крысы (полученных, как описано в **Примере 3**) в полном адъюванте Фрейда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), pH 7,4. С двухнедельными интервалами мышам дважды подкожно вводили 50 мкг полипептидов rMASP-2 или rMASP-2A человека или крысы в неполном адъюванте Фрейда. На четвертой неделе мышам вводили 50 мкг полипептидов rMASP-2 или rMASP-2 человека или крысы в PBS и подвергали слиянию через 4 дня.

Для каждого слияния приготавливали суспензии отдельных клеток из селезенки иммунизированной мыши и использовали для слияния с миеломными клетками Sp2/0. 5×10^8 клеток Sp2/0 и 5×10^8 клеток селезенки подвергали слиянию в среде, содержащей 50% полиэтиленгликоля (с мол. массой 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) и 5% диметилсульфоксида (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Затем клетки доводили до концентрации $1,5\times10^5$ клеток селезенки в 200 мкл суспензии в среде Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.) с добавкой 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина. Двести микролитров суспензии клеток добавляют в каждую лунку примерно двадцати 96-луночных микрокультуральных планшетов. Приблизительно через десять дней культуральные супернатанты отбирали для скрининга на реактивность с очищенным фактором MASP-2 в анализе ИФА.

Анализ ИФА: Лунки микропланшетов для тестов Immulon® 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покрывали путем добавки 50 мкл очищенного hMASP-2 при 50 нг/мл или rMASP-2 (или rMSP-2A) крысы в течение ночи при комнатной температуре. Низкая концентрация MASP-2 для покрытия позволяет отбирать высокоаффинные антитела. После удаления покрывающего раствора при постукивании планшета, по 200 мкл BLOTTO (обезжиренного сухого молока) в PBS добавляли в каждую лунку на один

час для блокирования неспецифических сайтов. Через час лунки промывали буфером PBST (PBS, содержащим 0,05% Tween 20). По пятьдесят микролитров культурального супернатанта из каждой лунки после слияния отбирали и смешивалис с 50 мкл BLOTTO, после чего добавляли в отдельные лунки микропланшетов для тестирования. После инкубирования в течение одного часа, лунки промывали PBST. Затем связанные мышиные антитела детектировали в реакции с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) антителами козы против мышиного IgG (Fc-специфичными) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) и разводили 1:2000 в BLOTTO. Раствор субстрата пероксидазы, содержащий 0,1% 3,3,5,5-тетраметилбензидина (Sigma, St. Louis, Mo.) и 0,0003% пероксида водорода (Sigma), добавляли в лунки для проявления окраски на 30 минут. Реакцию останавливали добавлением по 50 мкл 2M H_2SO_4 на лунку. Оптическую плотность реакционной смеси при 450 нм считывали при помощи спектрофотометра BioTek ELISA (BioTek® instruments, Winooski, Vt.).

Анализ связывания MASP-2:

Культуральные супернатанты, которые дают положительный результат в ИФА с MASP-2, описанном выше, можно тестировать в анализе связывания для определения аффинности связывания, которой обладают MASP-2-ингибирующие средства в отношении MASP-2. Аналогичный анализ также может использоваться для определения, связываются ли ингибирующие средства с другими антигенами в системе комплемента.

Лунки полистирольного микротитрационного планшета (96-луночные планшеты со средним связыванием, Corning Costar, Cambridge, MA) покрывали MASP-2 (20 нг/100 мкл/лунка, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), pH 7,4, в течение ночи при 4°C. После аспирации раствора MASP-2, лунки блокировали PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma Chemical) в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки без покрытия MASP-2 служили в качестве контроля фонового сигнала. В лунки добавляли аликвоты гибридомных супернатантов или очищенные мАт против MASP-2 в различных концентрациях в блокирующем растворе. После 2 ч инкубирования при комнатной температуре, лунки тщательно промывали PBS. Связанные с MASP-2 мАт против MASP-2 детектировали при добавлении пероксидаза-коньюгированных козьих антител против мышиного IgG (Sigma Chemical) в блокирующем растворе, которые оставляли для инкубирования на 1 час при комнатной температуре. Планшет еще раз тщательно промывали PBS и добавляли 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцию TMB гасили добавлением 100 мкл 1 M ортофосфорной кислоты и считывали планшет при 450 нм в спектрофотометре для микропланшетов (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Культуральные супернатанты из положительных лунок затем тестировали на способность ингибировать активацию комплемента в функциональном анализе, таком как анализ расщепления C4, как описано в **Примере 2**. Клетки в положительных лунках затем

клонировали методом предельного разведения. МАт снова тестировали на реактивность с hMASP-2 с помощью анализа ИФА, как описано выше. Отобранные гибриды выращивали в роллерных флаконах, и супернатант отработанных культур собирали для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии с белком А.

ПРИМЕР 6

В данном примере описано создание и получение гуманизированных мышиных антител против MASP-2 и фрагментов антител.

Мышиное моноклональное антитело против MASP-2 получали в самцах мышей A/J, как описано в **Примере 5**. Затем мышиное антитело гуманизировали, как описано ниже, для уменьшения его иммуногенности путем замены мышиных константных областей их человеческими аналогами, с получением химерного IgG и Fab-фрагмента антитела, который можно применять для ингибирования нежелатных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у пациентов в соответствии с настоящим изобретением.

1. Клонирование генов вариабельной области против MASP-2 из мышиных гибридомных клеток. Суммарную РНК выделяли из гибридомных клеток, секретирующих мАт против MASP-2 (полученных, как описано в Примере 7), с помощью RNAzol, согласно протоколу производителя (Biotech, Houston, Tex.). Первую цепь кДНК синтезировали с суммарной РНК при использовании олиго dT в качестве праймера. ПЦР проводили с использованием 3'-праймеров, подобранных к константной С-области иммуноглобулина, и наборов вырожденных праймеров, подобранных к лидерному пептиду или первой каркасной области мышиных V_H или V_K генов, в качестве 5'-праймеров. ПЦР с якорными праймерами проводили, как описано Chen и Platsucas (Chen, P.F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992). Для клонирования V_K гена, получали двухцепочечную кДНК с использованием праймера NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38). Отожженные адапторы AD1 (5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39) и AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40) лигировали как с 5'- и с 3'-концами двухцепочечной кДНК. Адапторы на 3'-концах удаляли при расщеплении NotI. Затем расщепленный продукт использовали в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 в качестве 5'-праймера и MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41) в качестве 3'-праймера. Фрагменты ДНК размером примерно 500 пн клонировали в pUC19. Несколько клонов отбирали для анализа последовательности, чтобы подтвердить, что клонированная последовательность содержит ожидаемую константную область иммуноглобулина мыши. Олигонуклеотиды NotI-MAK1 и MAK2 были получены из V_K-области и имели размер 182 и 84 пн, соответственно, после первой пары оснований гена С каппа. Отбирали клоны, которые включали полную V_K и лидерный пептид.

Для клонирования V_H гена получали двухцепочечную кДНК с использованием праймера NotI-MAG1 (5'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42).

Отожженные адапторы AD1 и AD2 лигировали с 5'- и с 3'-концами двухцепочечной кДНК. Адаптеры на 3'-концах удаляли при расщеплении NotI. Расщепленный продукт использовали в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 и MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43) в качестве праймеров. Фрагменты ДНК длиной от 500 до 600 пн клонировали в pUC19. Олигонуклеотиды NotI-MAG1 и MAG2 были получены из области Cγ.7.1 мыши и имели размер 180 и 93 пн, соответственно, после первой пары нуклеотидов гена Cγ.7.1 мыши. Отбирали клоны, которые включали полную V_H и лидерный пептид.

2. Конструирование векторов экспрессии для химерного MASP-2 IgG и Fab. Клонированные гены V_H и V_K, описанные выше, использовали в качестве матриц в реакции ПЦР для добавления консенсусной последовательности Козак на 5'-конец и сплайс-донора на 3'-конец нуклеотидной последовательности. После анализа последовательностей для подтверждения отсутствия ошибок ПЦР, гены V_H и V_K встраивали в кассеты вектора экспрессии, содержащие человеческие Cγ.1 и C. каппа, соответственно, с получением pSV2neoV_H-huCγ1 и pSV2neoV-huCγ. Плазмидные ДНК векторов тяжелой и легкой цепи, очищенные в градиенте CsCl, использовали для трансфекции клеток COS с помощью электропорации. Через 48 часов культуральный супернатант исследовали с помощью ИФА для подтверждения присутствия примерно 200 нг/мл химерного IgG. Клетки собирали и получали суммарную РНК. Первую цепь кДНК синтезировали с суммарной РНК при использовании олиго-dT в качестве праймера. Эту кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР для получения фрагментов ДНК Fd и каппа. Для гена Fd, ПЦР проводили с использованием 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3' (SEQ ID NO:44) в качестве 5'-праймера и CH1-производного 3'-праймера (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45). Подтверждали, что последовательность ДНК содержала полный V_H и CH1-домен IgG1 человека. После расщепления нужными ферментами, ДНК-фрагменты Fd встраивали по сайтам рестрикции HindIII и BamHI в кассету вектора экспрессии pSV2dhfr-TUS с получением pSV2dhfrFd. Плазмида pSV2 доступна в продаже и состоит из сегментов ДНК из разных источников: ДНК pBR322 (тонкая линия) содержит точку начала репликации ДНК из pBR322 (pBR ori) и лактамазный ген устойчивости к ампициллину (Amp); ДНК SV40, представленная более широкой штриховкой и помеченная, содержит точку начала репликации ДНК SV40 (SV40 ori), ранний промотор (5' к генам dhfr и neo) и сигнал полиаденилирования (3' к генан dhfr и neo). Сигнал полиаденилирования из SV40 (pA) также помещен на 3'-конце гена Fd.

Для гена каппа, ПЦР проводили с использованием 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46) в качестве 5'-праймера и подобранного к C_K 3'-праймера (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47). Было подтверждено, что последовательность ДНК содержит полные области V_K и C_K человека. После расщепления соответствующими рестриктазами, ДНК-

фрагменты каппа встраивали по сайтам рестрикции HindIII и BamHI в кассету вектора экспрессии pSV2neo-TUS с получением pSV2neoK. Экспрессию генов Fd и kappa направляли энхансерный и промоторный элементы из ЦМВЧ. Поскольку ген Fd не включает аминокислотный остаток цистеина, участвующий в образовании дисульфидных связей между цепями, этот рекомбинантный химерный Fab содержит нековалентно связанные тяжелые и легкие цепи. Этот химерный Fab обозначили как cFab.

Для получения рекомбинантного Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями, вышеуказанный ген Fd может быть удлинен для включения кодирующей последовательности дополнительных 9 аминокислот (EPKSCDKTH SEQ ID NO:48) из шарнирной области IgG1 человека. Сегмент ДНК BstEII-BamHI, кодирующий 30 аминокислот на 3'-конце гена Fd, может быть заменен сегментами ДНК, кодирующими удлиненный Fd, с получением в результате pSV2dhfrFd/9aa.

3. Экспрессия и очистка химерного IgG против MASP-2

Для создания линий клеток, секретирующих химерный IgG против MASP-2, клетки NSO трансфицировали очищенными плазмидными ДНК pSV2neoV_H-huC.γ1 и pSV2neoV-huC.kappa с помощью электропорации. Трансфицированные клетки отбирали в присутствии 0,7 мг/мл G418. Клетки выращивали в роллерном флаконе объемом 250 мл с использованием содержащей сыворотку среды.

Культуральный супернатант 100 мл роллерной культуры наносили на 10-мл колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, NJ). Колонку промывали PBS (10 объемами сорбента). Связанное антитело элюировали 50 мМ цитратного буфера, pH 3,0. Равный объем 1 М Hepes, pH 8,0 добавляли к фракции, содержащей очищенное антитело, для доведения pH до 7,0. Остаточные соли удаляли при замене буфера на PBS с помощью мембранной ультрафильтрации Millipore (отсечение по мол. массе: 3000). Концентрацию белка очищенного антитела определяли методом BCA (Pierce).

4. Экспрессия и очистка химерного Fab против MASP-2

Для создания линий клеток, секретирующих химерный Fab против MASP-2, клетки CHO трансфицировали очищенными плазмидными ДНК pSV2dhfrFd (или pSV2dhfrFd/9aa) и pSV2neokappa с помощью электропорации. Трансфицированные клетки отбирали в присутствии G418 и метотрексата. Отобранные линии клеток размножали при повышаемых концентрациях метотрексата. Клетки представляли собой одиночные клетки, субклонированные методом предельных разведений. Затем высокопродуктивные клеточные линии, субклонированные из одиночных клеток, выращивали в 100 мл роллерной культуры при использовании бессывороточной среды.

Химерный Fab против MASP-2 очищали с помощью аффинной хроматографии при использовании мышиного антиидиотипического мАт к мАт против MASP-2. Антиидиотипическое мАт к MASP-2 может быть получено при иммунизации мышей мышиным мАт против MASP-2, конъюгированным с гемоцианином лимфы моллюска замочной скважины (KLH), и скрининге специфичного связывания мАт, которое может конкурировать с MASP-2 человека. Для очистки, 100 мл супернатанта роллерной

культуры клеток CHO, продуцирующих cFab или cFab/9aa, наносили на аффинную колонку в сочетании с антиидиотипическим мАт против MASP-2. Затем колонку тщательно промывали PBS, после чего связанный Fab элюировали 50 мМ диэтиламином, pH 11,5. Остаточные соли удаляли при замене буфера, как описано выше. Концентрацию белка очищенного Fab определяли методом BCA (Pierce).

Способность химерных MASP-2 IgG, cFab, и eFAb/9aa ингибировать MASP-2-зависимые пути комплемента можно определить с помощью ингибиторных анализов, описанных в Примере 2 или Примере 7.

ПРИМЕР 7

В данном примере описан анализ расщепления C4 in vitro, используемый в качестве функционального скрининга для идентификации MASP-2-ингибирующих средств, способных блокировать MASP-2-зависимую активацию комплемента через L-фиколин/P35, H-фиколин, M-фиколин или маннан.

Анализ расщепления C4: Анализ расщепления C4 был описан в публикации Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001, в которой измеряли активацию лектинового пути, вызванную липотехоевой кислотой (LTA) из S. aureus, которая связывает L-фиколин.

Реагенты: Фиксированный в формалине S. aureus (DSM20233) приготавливали следующим образом: бактерии выращивали в течение ночи при 37°C в триптиказо-соевой кровяной среде, три раза промывали PBS, затем фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS/0,5 формалина и еще три раза промывали PBS, после чего ресуспендировали в буфере для покрытия (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

Анализ: Лунки микротитрационного планшета Nunc MaxiSorb® (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покрывали: 100 мкл фиксированного в формалине S. aureus DSM20233 ($0D_{550}$=0,5) в покрывающем буфере и 1 мкг L-фиколина в покрывающем буфере. После инкубирования в течение ночи, лунки блокировали 0,1% человеческим сывороточным альбумином (HSA) в TBS (10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4), затем промывали TBS, содержащим 0,05%, Tween 20 и 5 мМ $CaCl_2$ (промывочный буфер). Образцы человеческой сыворотки разводили в 20 мМ Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, что предотвращает активацию эндогенного C4 и вызывает диссоциацию комплекса C1 (состоящего из C1q, C1r и C1s). MASP-2-ингибирующие средства, в том числе мАт против MASP-2 и ингибирующие пептиды, добавляли к образцам сыворотки в разных концентрациях. Разведенные образцы добавляли в планшет и инкубировали в течение ночи при 4°C. Через 24 часа планшеты тщательно промывали промывочным буфером, затем в каждую лунку добавляли 0,1 мкг очищенного человеческого C4 (полученного, как описано в Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл 4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4. Через 1,5 ч при 37°C, планшеты снова промывали и детектировали отложение C4b с использованием конъюгированных со щелочной фосфатазой куриных антител против C4c человека (полученных от Immunsystem, Uppsala, Sweden) и измеряли при использовании

колориметрического субстрата p-нитрофенилфосфата.

Анализ C4 на маннане: Описанный выше анализ адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством МСЛ путем покрытия планшета ЛПС и маннаном перед добавлением сыворотки крови, смешанной с различными MASP-2-ингибирующими средствами.

Анализ C4 на H-фиколине (Hakata Ag): Описанный выше анализ адаптировали для измерения активации лектинового пути посредством H-фиколина путем покрытия планшета ЛПС и H-фиколином перед добавлением сыворотки крови, смешанной с различными MASP-2-ингибирующими средствами.

ПРИМЕР 8

Следующий анализ демонстрирует присутствие активации по классическому пути у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-.

Методы: Иммунные комплексы получали in situ путем покрытия микротитрационных планшетов (Maxisorb, Nunc, номер по кат. 442404, Fisher Scientific) 0,1% человеческим сывороточным альбумином в 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, pH 7,4 в течение 1 часа при комнатной температуре, с последующим инкубированием в течение ночи при температуре 4°C с овечьей антисывороткой против цельной сыворотки (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Scotland), разведенной 1:1000 в TBS/tween/Ca^{2+}. Образцы сыворотки получали от мышей дикого типа и мышей MASP-2-/-, и добавляли в покрытые планшеты. Подготавливали контрольные образцы, в которых C1q был удален в образцах сыворотки дикого типа и MASP-2-/-. Обедненную C1q мышиную сыворотка подготавливали при использовании Dynabeads® с иммобилизованным белком A (Dynal Biotech, Oslo, Norway), покрытых IgG кролика против C1q человека (Dako, Glostrup, Denmark) в соответствии с инструкциям поставщика. Планшеты инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Связанный C3b детектировали поликлональным антителом против человеческого C3c (Dako A 062), разведенным в TBS/tw/Ca^{++} 1:1000. Вторичным антителом являлось козье антитело против IgG кролика.

Результаты: На ФИГУРЕ 7 показаны относительные уровни отложения C3b на планшетах, покрытых IgG, в сыворотке дикого типа, сыворотке MASP-2-/-, C1q-обедненной сыворотке дикого типа и C1q-обедненной сыворотке MASP-2-/-. Эти результаты демонстрируют, что классический путь является интактным в линии мышей MASP-2-/-.

ПРИМЕР 9

Следующий анализ используется для проверки, блокирует ли MASP-2-ингибирующее средство классический путь, путем анализа эффекта MASP-2-ингибирующего средства при состояниях, при которых классический путь инициируется иммунными комплексами.

Методы: Для исследования влияния MASP-2-ингибирующего средства на состояния активации комплемента, когда классический путь инициируется иммунными комплексами, по 50 мкл образцов в трех повторностях, содержащих 90% NHS,

инкубировали при 37°C в присутствии 10 мкг/мл иммунных комплексов (IC) или PBS, а также параллельно включали образцы в трех повторностях (+/-IC), которые содержали 200 нМ моноклонального антитела против пропердина во время инкубирования при 37°C. После двух часов инкубирования при 37°C, ко всем образцам добавляли 13 мМ ЭДТА для остановки дальнейшей активации комплемента, и сразу охлаждали образцы до 5°C. После этого образцы хранили при температуре -70°C до анализа на продукты активации комплемента (C3a и sC5b-9) при использовании наборов ИФА (Quidel, номера по кат. A015 и A009) согласно инструкциям производителя.

ПРИМЕР 10

В данном примере описана идентификация высокоаффинных Fab2-фрагментов антитела против MASP-2, блокирующих активность MASP-2.

Теоретические основы и обоснование: MASP-2 представляет собой сложный белок с множеством отдельных функциональных доменов, включающих: участок(ки) связывания МСЛ и фиколинов, каталитический центр сериновой протеазы, участок связывания протеолитического субстрата C2, участок связывания протеолитического субстрата C4, участок расщепления MASP-2 для аутоактивации зимогена MASP-2 и два участка связывания Ca^{++}. Были идентифицированы Fab2-фрагменты антитела, которые связываются с высокой аффинностью с MASP-2, и такие Fab2-фрагменты исследовали в функциональном анализе с целью определения, могут ли они блокировать функциональную активность MASP-2.

Для блокирования функциональной активности MASP-2, антитело или Fab2-фрагмент антитела должны связывать и блокировать структурный эпитоп на MASP-2, который необходим для функциональной активности MASP-2. Таким образом, высокоаффинные связывающие Fab2 против MASP-2 могут практически не препятствовать функциональной активности MASP-2, если только они не связываются со структурными эпитопами на MASP-2, которые непосредственно участвуют в функциональной активности MASP-2.

Функциональный анализ, который позволяет измерять ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" Fab2 против MASP-2. Известно, что основная физиологическая роль MASP-2 в лектиновом пути заключается в образовании следующего функционального компонента лектин-опосредованного пути комплемента, а именно: C3-конвертазы лектинового пути. C3-конвертаза лектинового пути является важным ферментативным комплексом (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 с образованием C3a и C3b. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); тем не менее, функциональная активность MASP-2 требуется для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые включают C3-конвертазу лектинового пути. Кроме того, каждая из отдельных функциональных активностей MASP-2, перечисленных выше, по-видимому, требуется для того, чтобы MASP-2 образовывала C3-конвертазу лектинового пути. По этим причинам, предпочтительным анализом для использования при оценке

"блокирующей активности" Fab2-фрагментов против MASP-2 считается функциональный анализ, который позволяет измерять ингибирование образования С3-конвертазы лектинового пути.

Создание высокоаффинных Fab2-фрагментов: Библиотеку фагового дисплея, содержащую вариабельные последовательности легких и тяжелых цепей антител человека, и технологию автоматизированного отбора антител для идентификации Fab2-фрагментов, которые реагируют с выбранными лигандами, представляющими интерес, использовали для создания высокоаффинных Fab2-фрагментов к белку MASP-2 крысы (SEQ ID NO:55). Известное количество белка MASP-2 крысы (~1 мг, чистота >85%) использовали для скрининга антител. Три раунда амплификации использовали для отбора антител с наилучшей аффинностью. Примерно 250 различных отобранных частиц, экспрессирующих фрагменты антител, были выбраны для ИФА-скрининга. Высокоаффинные фрагменты затем секвенировали для определения уникальности различных антител.

Пятьдесят уникальных антител против MASP-2 были очищены, и по 250 мг каждого очищенного Fab2-антитела использовали для анализа аффинности связывания MASP-2 и функционального анализа пути комплемента, как более подробно описано ниже.

Анализы, использованные для оценки ингибирующей (блокирующей) активности Fab2-фрагментов против MASP-2

1. Анализ для измерения ингибирования образования С3-конвертазы лектинового пути:

Теоретические основы: С3-конвертаза лектинового пути представляет собой ферментативный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет С3 на два мощных провоспалительных фрагмента, анафилатоксин С3а и опсонический С3b. Формирование С3-конвертазы, представляется ключевой стадией в лектиновом пути в отношении опосредования воспаления. MASP-2 не является структурным компонентом С3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); поэтому антитела против MASP-2 (или Fab2) не должны напрямую ингибировать активность уже существующей С3-конвертазы. Впрочем, активность сериновой протеазы MASP-2 требуется для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые составляют С3-конвертазу лектинового пути. Таким образом, Fab2 против MASP-2, который ингибирует функциональную активность MASP-2 (т.е., блокирующий Fab2 против MASP-2) будет подавлять de novo образование С3-конвертазы лектинового пути. С3 содержит необычную и крайне реакционноспособную тиоэфирную группу в качестве части своей структуры. После расщепления С3 под действием С3-конвертазы в этом анализе, тиоэфирная группа на С3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминогруппами макромолекул, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает детектирование С3b в анализе ИФА.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В

следующем способе измерения образования С3-конвертазы, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°С с разведенной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и проводили анализ на С3b, иммобилизованный на лунках, при использовании стандартных методов ИФА. Количество С3b, образующееся в этом анализе, является прямым отражением de novo образования С3-конвертазы лектинового пути. В этом анализе Fab2-фрагменты против MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали на их способность подавлять образование С3-конвертазы и последующее образование С3b.

Методы:

96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°С с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации 1 мкг/50 мкл/лунка. После инкубирования в течение ночи, каждую лунку три раза промывали 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 100 мкл/лунка 1% бычьим сывороточным альбумином в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с легким перемешиванием. Затем каждую лунку три раза промывали 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разводили до выбранной концентрации в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере CFP (4,0 мМ барбитала, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатина, pH 7,4) при 5°С. В вышеуказанные образцы добавляли 0,5% сыворотку крысы при 5°С и по 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 30 минут в водяной бане при 37°С для активации комплемента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°С в контейнер, содержащий смесь воды со льдом. Каждую лунку пять раз промывали 200 мкл PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем два раза промывали 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка первичного антитела в разведении 1:10000 (антитело кролика против С3с человека, DAKO A0062) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали 1 час при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка вторичного антитела в разведении 1:10000 (конъюгированное с пероксидазой антитело козы против IgG кролика, American Qualex A102PU) в PBS, содержащим 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре на шейкере с легким перемешиванием. Каждую лунку пять раз промывали 200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 100 мкл/лунка 1,0 М H_3PO_4 и измеряли OD_{450}.

2. Анализ для измерения ингибирования MASP-2-зависимого расщепления С4

Теоретические основы: Активность сериновой протеазы MASP-2 является высокоспецифичной, при этом было обнаружено только два белковых субстрата MASP-2: С2 и С4. Расщепление С4 дает С4а и С4b. Fab2 против MASP-2 может связываться со структурными эпитопами на MASP-2, которые непосредственно участвуют в расщеплении С4 (например, участком связывания С4 на MASP-2; каталитическим

центром сериновой протеазы MASP-2), и, таким образом, ингибировать функциональную активность MASP-2 при расщеплении C4.

Дрожжевой маннан, как известно, является активатором лектинового пути. В следующем способе измерения C4-расщепляющей активности MASP-2, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 минут при 37°C с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Поскольку первичное антитело, используемое в этом анализе ИФА, распознает только C4 человека, к разбавленной крысиной сыворотке также добавляли C4 человека (1,0 мкг/мл). Затем лунки промывали и проводили анализ на C4b человека, иммобилизованный в лунках, при использовании стандартных методов ИФА. Количество C4b, образующееся в этом анализе, является показателем MASP-2-зависимой C4-расщепляющей активности. В этом анализе Fab2 против MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали на их способность ингибировать расщепление C4.

Методы: 96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации 1,0 мкг/50 мкл/лунка. Каждую лунку 3× промывали 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали 100 мкл/лунка 1% бычьим сывороточным альбумином в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку 3 раза промывали 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разодили до выбранной концентрации в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 мМ барбитала, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатина, pH 7,4) при 5°C. В эти образцы также включали 1,0 мкг/мл C4 человека (Quidel). К вышеуказанным образцам добавляли 0,5% сыворотку крысы при 5°C и по 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты закрывали и инкубировали 30 минут в водяной бане при 37°C для активации комплемента. Реакцию останавливали путем переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь воды со льдом. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем каждую лунку промывали 2×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка разведенных 1:700 конъюгированных с биотином куриных антител против C4c человека (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубировали один час при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка 0,1 мкг/мл коньюгированного с пероксидазой стрептавидина (Pierce Chemicals #21126) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл BSA, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре на шейкере с легким перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 100 мкл/лунка 1,0 М H_3PO_4 и измеряяли OD_{450}.

3. Анализ связывания Fab2 против MASP-2 крысы с 'нативным' MASP-2 крысы

Теоретические основы: MASP-2, как правило, присутствует в плазме крови в виде димерного комплекса MASP-2, который также включает специфические лектиновые молекулы (маннозосвязывающий белок (МСЛ) и фиколины). Таким образом, если присутствует заинтересованность в изучении связывания Fab2 против MASP-2 с физиологически релевантной формой MASP-2, важно разработать такой анализ связывания, в котором используется взаимодействие между Fab2 и 'нативным' MASP-2 в плазме, а не с очищенным рекомбинантным MASP-2. В этом анализе связывания комплекс 'нативного' MASP-2-МСЛ из 10% крысиной сыворотки сначала иммобилизировали на покрытых маннаном лунках. Затем изучали аффинность связывания различных Fab2-фрагментов против MASP-2 с иммобилизованным 'нативным' MASP-2 при использовании стандартной методики ИФА.

Методы: 96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации 1 мкг/50 мкл/лунка. Каждую лунку 3 раза промывали 200 мкл PBS. Лунки блокировали 100 мкл/лунка 0,5% обезжиренным сухим молоком в PBST (PBS с 0,05% Tween 20) и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку 3 раза промывали 200 мкл TBS/Tween/Ca^{++}. Промывочный буфер (Tris-забуференный солевой раствор, 0,05% Tween 20, содержащий 5,0 мМ $CaCl_2$, pH 7,4, 10% крысиной сыворотки в связывающем буфере с высокой концентрацией соли (20 мМ Tris, 1,0 М NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05% Triton-X100, 0,1% (в/об) бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4)) приготавливали на льду. Добавляли 100 мкл/лунка и инкубировали в течение ночи при 5°C. Лунки 3 раза промывали 200 мкл промывочного буфера TBS/Tween/Ca^{++}. Затем лунки 2 раза промывали 200 мкл TBS. Добавляли 100 мкл/лунка выбранной концентрации Fab2 против MASP-2, разведенного в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 мМ барбитала, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатина, pH 7,4), и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка HRP-конъюгированного антитела козы против Fab2 (Biogenesis, номер по кат. 0500-0099), разведенного 1:5000 в 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в PBS, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с легким перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунка субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 70 мин. Пероксидазную реакцию останавливали путем добавления 100 мкл/лунка 1,0 М H_3PO_4 и измеряли OD_{450}.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Примерно 250 разных Fab2-фрагментов, которые с высокой аффинностью реагировали с белком MASP-2 крысы, отобрали для ИФА-скрининга. Эти высокоаффинные Fab2-фрагменты секвенировали для определения уникальности различных антител, и 50 уникальных антител против MASP-2 были очищены для дальнейшего анализа. По 250 мкг каждого очищенного Fab2-антитела использовали для

анализа аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента. Результаты этого анализа показаны ниже, в ТАБЛИЦЕ 6.

ТАБЛИЦА 6: FAB2 ПРОТИВ MASP-2, КОТОРЫЕ БЛОКИРУЮТ АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА ПО ЛЕКТИНОВОМУ ПУТИ

# Fab2 антитела	Конвертаза C3 (IC_{50} (нМ)	K_d	Расщепление C4 IC_{50} (нМ)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 нМ
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

Как показано выше в ТАБЛИЦЕ 6, из 50 протестированных Fab2 против MASP-2, семнадцать Fab2 были идентифицированы как MASP-2-блокирующие Fab2, которые мощно ингибируют образование C3-конвертазы с IC_{50}, меньше или равной 10 нМ Fab2 (34% положительных результатов). Восемь из семнадцати идентифицированных Fab2 имели IC_{50} в субнаномолярном диапазоне. Кроме того, все семнадцать MASP-2-блокирующих Fab2, показанных в ТАБЛИЦЕ 6, обеспечивали по существу полное ингибирование образования C3-конвертазы в анализе C3-конвертазы лектинового пути. На ФИГУРЕ 8A графически проиллюстрированы результаты анализа образования C3-конвертазы для Fab2-антитела #11, которое является репрезентативным антителом из других протестированных Fab2-антител, результаты которых показаны в ТАБЛИЦЕ 6. Это важное замечание, поскольку теоретически возможно, что "блокирующий" Fab2 может лишь частично ингибировать функцию MASP-2, даже если каждая молекула MASP-2 связана Fab2.

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, теоретически возможно, что присутствие антител против маннана в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и давать C3b через C3-конвертазу классического пути.

Однако каждый из семнадцати блокирующих Fab2 против MASP-2, перечисленных в этом примере, сильно ингибирует образование C3b (>95%), что демонстрирует специфичность этого анализа в отношении C3-конвертазы лектинового пути.

Анализы связывания также проводили со всеми семнадцатью блокирующими Fab2, чтобы вычислить кажущуюся K_d для каждого. Результаты анализов связывания Fab2 против MASP-2 крысы с нативным крысиным MASP-2 для шести блокирующих Fab2 также показаны в ТАБЛИЦЕ 6. На ФИГУРЕ 8B графически проиллюстрированы результаты анализа связывания с Fab2-антителом #11. Аналогичные анализы связывания также были получены для других Fab2, результаты которых показаны в ТАБЛИЦЕ 6. В целом, кажущиеся K_d, полученные для связывания каждого из шести Fab2 с 'нативным' MASP-2, достаточно хорошо согласуются с IC_{50} для Fab2 в функциональном анализе C3-конвертазы. Имеются сведения, что MASP-2 подвергается конформационным изменениям из 'неактивной' в 'активную' форму при активации своей протеазной активности (Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). В нормальной крысиной плазме, используемой в анализе образования C3-конвертазы, MASP-2 присутствует преимущественно в 'неактивной' конформации зимогена. Напротив, в анализе связывания MASP-2 присутствует в виде части комплекса с МСЛ, связанным с иммобилизованным маннаном; следовательно, MASP-2 будет в 'активной' конформации (Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). Следовательно, не следует ожидать точного соответствия между IC_{50} и K_d для каждого из семнадцати блокирующих Fab2, протестированных в этих двух функциональных анализах, поскольку в каждом анализе Fab2 будет связывать другую конформационную форму MASP-2. Тем не менее, за исключением Fab2 #88, существует достаточно близкое соответствие между IC_{50} и кажущейся Kd для каждого из остальных шестнадцати Fab2, протестированных в двух анализах (см. ТАБЛИЦУ 6).

Несколько блокирующих Fab2 оценивали на предмет ингибирования MASP-2-опосредованного расщепления C4. На ФИГУРЕ 8C графически приоллюстрирует результаты анализа расщепления C4, показывающие ингибирование Fab2 #41 с IC50=0,81 нМ (см. ТАБЛИЦУ 6). Как показано на ФИГУРЕ 9, было обнаружено, что все протестированные Fab2 ингибируют расщепление C4 со значениями IC_{50}, подобными значениям, полученным в анализе C3-конвертазы (см. ТАБЛИЦУ 6).

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, теоретически возможно, что присутствие антител против маннана в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и, таким образом, приводить к образованию C4b в результате C1s-опосредованного расщепления C4. Впрочем, было идентифицировано несколько Fab2 против MASP-2, которые сильно ингибируют образование C4b (>95%), что демонстрирует специфичность этого анализа для MASP-2-опосредованного расщепления C4. C4, как и C3, содержит необычную и крайне реакционноспособную тиоэфирную группу в качестве части своей структуры. При расщеплении C4 под действием MASP-2 в этом анализе тиоэфирная группа на C4b может образовывать

ковалентную связь с гидроксильными группами или аминогруппами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает обнаружение C4b в анализе ИФА.

Эти исследования четко демонстрируют создание высокоаффинных Fab2-фрагментов к белку MASP-2 крысы, которые функционально блокируют активность как C4, так и C3-конвертазы, предотвращая, таким образом, активацию лектинового пути.

ПРИМЕР 11

В этом примере описано картирование эпитопов для нескольких блокирующих Fab2-антител против MASP-2 крысы, которые были созданы, как описано в Примере 10.

Методы:

Как показано на **ФИГУРЕ 10**, следующие белки, все с N-концевыми 6×His метками, экспрессировали в клетках CHO с использованием вектора pED4:

крысиный MASP-2A, полноразмерный белок MASP-2, инактивированный заменой серина в активном центре на аланин (S613A);

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

CUBI-II, N-концевой фрагмент MASP-2 крысы, содержащий только CUBI, EGF-подобный и CUBII домены; и

CUBI/EGF-подобный, N-концевой фрагмент MASP-2 крысы, который содержит только CUBI и EGF-подобный домены.

Эти белки очищали из культуральных супернатантов с помощью никель-аффинной хроматографии, как описано ранее (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

C-концевой полипептид (CCPII-SP), содержащий CCPII и домен сериновой протеазы MASP-2 крысы, экспрессировали в E.coli в виде тиоредоксин-слитого белка с использованием pTrxFus (Invitrogen). Белок очищали из клеточных лизатов при использовании аффинной смолы Thiobond. Партнер по слиянию тиоредоксин экспрессировали из пустого pTrxFus в качестве отрицательного контроля.

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

ДОТ-БЛОТ АНАЛИЗ:

Серийные разведения пяти рекомбинантных полипептидов MASP-2, описанных выше и показанных на **ФИГУРЕ 10** (и полипептида тиоредоксина в качестве отрицательного контроля для полипептида CCPII-сериновой протеазы), переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Количество белка в пятнах варьировало от 100 нг до 6,4 пг с пятикратным шагом. В более поздних экспериментах количество белка в пятнах варьировало от 50 нг до 16 пг, опять же с пятикратным шагом. Мембраны блокировали 5% сухим обезжиренным молоком в TBS (блокирующий буфер), затем инкубировали с 1,0 мкг/мл Fab2-фрагментов против MASP-2 в блокирующем буфере (содержащем 5,0 мМ Ca^{2+}). Связанные Fab2-фрагменты детектировали с использованием HRP-конъюгата против человеческого Fab (AbD/Serotec; в разведении 1/10000) и набора для

детектирования ECL (Amersham). Одну мембрану инкубировали с поликлональными кроличьими антителами против MASP-2 человека (описанными в публикации Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)) в качестве положительного контроля. В этом случае связанное Ат детектировали при использовании HRP-конъюгированного козьего антитела против IgG кролика (Dako; в разведении 1/2000).

Анализ связывания MASP-2

Планшеты для ИФА покрывали 1,0 мкг/лунка рекомбинантного полипептида MASP-2A или CUBI-II в карбонатном буфере (pH 9,0) в течение ночи при 4°C. Лунки блокировали 1% BSA в TBS, затем добавляли серийные разведения Fab2-фрагментов против MASP-2 в TBS, содержащем 5,0 мМ Ca^{2+}. Планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки TBS/tween/Ca^{2+} добавляли HRP-конъюгат против Fab человека (AbD/Serotec), разведенный 1/10000 в TBS/Ca^{2+}, и инкубировали планшеты еще в течение одного часа при КТ. Связанное антитело детектировали при использовании набора субстрата пероксидазы TMB (Biorad).

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Результаты дот-блоттинга, демонстрирующие реактивность Fab2-фрагментов с различными полипептидами MASP-2, представлены ниже в ТАБЛИЦЕ 7. Числовые значения, представленные в ТАБЛИЦЕ 7, указывают количество белка в пятнах, необходимое для получения примерно полумаксимальной интенсивности сигнала. Как показано, все полипептиды (за исключением одного партнера по слиянию тиоредоксина) распознавались Ат положительного контроля (поликлональная сыворотка против MASP-2 человека, индуцированная у кроликов).

ТАБЛИЦА 7: РЕАКТИВНОСТЬ С РАЗНЫМИ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ПОЛИПЕПТИДАМИ MASP-2 КРЫСЫ НА ДОТ-БЛОТАХ

# Fab2 антитела	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-подобный	CCPII-SP	Тиоредоксин
40	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
41	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
11	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
49	0,16 нг	NR	NR	>20 нг	NR
52	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
57	0,032 нг	NR	NR	NR	NR
58	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
60	0,4 нг	0,4 нг	NR	NR	NR
63	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
66	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
67	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
71	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR

81	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
86	0,4 нг	NR	NR	10 нг	NR
87	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
Положительный контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	NR

NR=Нет реакции. Антитело положительного контроля представляет собой поликлональную сыворотку против MASP-2 человека, индуцированную у кроликов.

Все Fab2-фрагменты реагировали с MASP-2A, а также с MASP-2K (данные не показаны). Большинство Fab2-фрагментов распознавали полипептид CCPII-SP, но не N-концевые фрагменты. Этиму двумя исключениями являются Fab2 #60 и Fab2 #57. Fab2 #60 распознает MASP-2A и фрагмент CUBI-II, но не распознает CUBI/EGF-подобный полипептид или полипептид CCPII-SP, что указывает на то, что он связывается с эпитопом в CUBII или охватывающим CUBII и EGF-подобный домен. Fab2 #57 распознает MASP-2A, но не распознает ни один из протестированных фрагментов MASP-2, что указывает на то, что этот Fab2 распознает эпитоп в CCP1. Fab2 #40 и #49 связывались только с полным MASP-2A. В ИФА анализе связывания, показанном на **ФИГУРЕ 11**, Fab2 #60 также связывался с полипептидом CUBI-II, хотя с немного более низкой кажущейся аффинностью.

Полученные данные демонстрируют обнаружение уникальных блокирующих Fab2-фрагментов в различных областях белка MASP-2.

ПРИМЕР 12

Этот пример описывает идентификацию, с помощью показа бактериофага, полностью человеческих scFv антител, связывающих с MASP-2 и ингибирующих установленную лектином активацию комплемента при оставлении классического (C1q-зависимого) компонента пути иммунной системы интактным.

Обзор:

Полностью человеческие, высокоаффинные антитела к MASP-2 были идентифицированы путем скрининга библиотеки фагового дисплея. Вариабельные фрагменты легкой и тяжелой цепи антител были выделены в формате scFv и в формате полноразмерных IgG. Человеческие антитела к MASP-2 могут применяться для ингибирования клеточного повреждения, связанного с опосредованной лектиновым путем активацией комплемента при сохранении интактного классического (C1q-зависимого) пути как компонента иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления, рассматриваемые MASP-2-ингибирующие антитела обладают следующими характеристиками: (a) высокой аффинностью к MASP-2 человека (например, с K_D 10 нМ или меньше) и (b) ингибируют MASP-2-зависимую активность комплемента в 90% сыворотке человека с IC_{50} 30 нМ или меньше.

Методы:

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2:

Полноразмерную последовательность кДНК MASP-2 человека (SEQ ID NO: 4), кодирующую полипептид MASP-2 человека с лидерной последовательностью (SEQ ID NO: 5), субклонировали в вектор экспрессии для клеток млекопитающих pCI-Neo (Promega), который направляет эукариотическую экспрессию под контролем энхансерной/промоторной области ЦМВ (описаной в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)).

Для получения каталитически неактивного белка MASP-2A человека проводили сайт-направленный мутагенез, как описано в заявке US 2007/0172483, включенной в настоящий документ посредством отсылки. ПЦР-продукты очищали после электрофореза в агарозном геле и выделения полос из геля, и вводили одиночные выступающие аденозины с использованием стандартной методики тейлинга. Затем MASP-2A с аденозиновым хвостом клонировали в вектор pGEM-T easy и трансформировали в E. coli. Затем человеческий MASP-2A субклонировали в один из векторов экспрессии для клеток млекопитающих, pED или pCI-Neo.

Экспрессионную конструкцию MASP-2A, описанную выше, трансфицировали в клетки DXB1 с использованием стандартной методики трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной среде, чтобы гарантировать, что препараты не содержали примеси других сывороточных белков. Среду собирали с конфлюэнтных клеток через день (в общей сложности четыре раза). Уровень рекомбинантного MASP-2A составил в среднем приблизительно 1,5 мг/л культуральной среды. MASP-2A (мутант Ser-Ala, описанный выше) очищали с помощью аффинной хроматографии на колонках с MBP-A-агарозой.

ИФА MASP-2A с ScFv клонами-кандидатами, идентифицированными с помощью пэннинга/scFv конверсии и фильтрационного скрининга

Библиотеку фагового дисплея, содержащую последовательности вариабельных областей легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина человека, подвергали антигенному пэннингу с последующим автоматизированным скринингом антител и отбором с целью идентификации высокоаффинных scFv антител к белку MASP-2 человека. Было проведено три раунда пэннинга scFv фаговой библиотеки против HIS-меченного или биотин-меченного MASP-2A. Третий раунд пэннинга элюировали сначала МСЛ, а затем ТЕА (щелочной). Для мониторинга специфического обогащения фагов, экспонирующих scFv фрагменты против MASP-2A мишени, проводили ИФА поликлональных фагов против иммобилизованного MASP-2A. Гены scFv из 3 раунда пэннинга клонировали в вектор экспрессии pHOG и подвергали мелкомасштабному фильтрационному скринингу для поиска специфичных клонов против MASP-2A.

Бактериальные колонии, содержащие плазмиды, кодирующие фрагменты scFv из третьего раунда пэннинга, перекалывали, помещали в сетке на нитроцеллюлозные мембраны и выращивали в течение ночи на неиндуцирующей среде с получением исходных чашек. Всего в третьем раунде пэннинга было отобрано и проанализировано 18000 колоний, половина из конкурентной элюции и половина из последующей ТЕА

элюции. Пэннинг фагмидной библиотеки scFv против MASP-2A с последующей конверсией scFv и фильтрационным скринингом дал 137 положительных клонов. 108/137 клонов были положительными в анализе ИФА на связывание MASP-2 (данные не показаны), из которых 45 клонов были дополнительно проанализированы на способность блокировать активность MASP-2 в нормальной человеческой сыворотке.

Анализ для измерения ингибирования образования С3-конвертазы лектинового пути

Функциональный анализ, который позволяет измерять ингибирование образования С3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" клонов-кандидатов scFv к MASP-2. Активность сериновой протеазы MASP-2 требуется для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые составляют С3-конвертазу лектинового пути. Таким образом, scFv к MASP-2, который ингибирует функциональную активность MASP-2 (т.е. блокирующий scFv к MASP-2), будет ингибировать de novo образование С3-конвертазы лектинового пути. С3 содержит необычную и крайне реакционноспособную тиоэфирную группу в качестве части своей структуры. При расщеплении С3 под действием С3-конвертазы в этом анализе тиоэфирная группа на С3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминогруппами макромолекул, иммобилизованных на дне пластиковых лунок посредством сложноэфирных или амидных связей, что облегчает обнаружение С3b в анализе ИФА.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В следующем методе измерения образования С3-конвертазы пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали с разведенной человеческой сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и проводили анализ на С3b, иммобилизованный в лунках, при использовании стандартных методов ИФА. Количество С3b, полученное в этом анализе, является прямым отражением de novo образования С3-конвертазы лектинового пути. Клоны scFv к MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе на их способность ингибировать образование С3-конвертазы и последующее образование С3b.

Методы:

45 клонов-кандидатов, идентифицированных, как описано выше, экспрессировали, очищали и разводили до такой же исходной концентрации, которую снова разводили в буфере GVB, содержащем Ca^{++} и Mg^{++} (4,0 мМ барбитала, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатина, pH 7,4), чтобы подтвердить, что все клоны содержат одинаковое количество буфера. Каждый из клонов scFv тестировали в трех повторностях при концентрации 2 мкг/мл. Положительным контролем являлся OMS100 Fab2, который тестировали в концентрации 0,4 мкг/мл. Образование С3с контролировали в присутствии и в отсутствие клонов scFv/IgG.

Маннан разводили до концентрации 20 мкг/мл (1 мкг/лунка) в 50 мМ карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3+35 мМ $NaHCO_3$+1,5 мМ NaN_3), pH 9,5, и покрывали планшет для

ИФА в течение ночи при 4°C. На следующий день покрытые маннаном планшеты 3 раза промывали 200 мкл PBS. Затем в лунки добавляли по 100 мкл 1% блокирующего раствора HSA и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза 200 мкл PBS и хранили на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Нормальную человеческую сыворотку разбавляли до 0,5% в буфере CaMgGVB и добавляли клоны scFv или положительный контроль OMS100 Fab2 в трех повторностях, в концентрации 0,01 мкг/мл; 1 мкг/мл (только контроль OMS100) и 10 мкг/мл в этом буфере, и предварительно инкубировали в течение 45 минут на льду перед добавлением в блокированный планшет для ИФА. Реакцию инициировали при инкубировании в течение одного часа при 37°C и останавливали, перенося планшеты в баню со льдом. Отложение C3b определяли с использованием кроличьего антитела против мышиного C3c, а затем с использованием козьего HRP-антитела против иммуноглобулина кролика. Отрицательный контроль представлял собой буфер без антитела (отсутствие антитела=максимальное отложение C3b), а положительный контроль представлял собой буфер с ЭДТА (отсутствие отложения C3b). Фоновый сигнал определяли, проводя тот же анализ, за исключением того, что лунки не содержали маннан. Фоновый сигнал против планшетов без маннана вычитали из сигналов в лунках, содержащих маннан. Пороговый критерий был установлен на уровне половины активности нерелевантного клона scFv (VZV) и только буфера.

Результаты: На основе порогового критерия было обнаружено, что всего 13 клонов блокируют активность MASP-2. Были отобраны и секвенированы все 13 клонов, вызывающих >50% супрессии пути, с получением 10 уникальных клонов. Было обнаружено, что все десять клонов имеют легкую цепь одного и того же подкласса, λ3, но тяжелые цепи трех разных подклассов: VH2, VH3 и VH6. В функциональном анализе пять из десяти клонов-кандидатов scFv давали значения IC_{50} нМ меньше целевых критериев 25 нМ при использовании 0,5% человеческой сыворотки.

Для идентификации антител с повышенной эффективностью три материнских клона scFv, идентифицированных, как описано выше, подвергали шафлингу легких цепей. Этот процесс включал создание комбинаторной библиотеки, состоящей из VH каждого из материнских клонов, спаренной с библиотекой интактных легких цепей лямбда (VL) человека, полученных от шести здоровых доноров. Затем эту библиотеку подвергали скринингу на присутствие клонов scFv с улучшенной аффинностью связывания и/или функциональностью.

ТАБЛИЦА 8: Сравнение функциональной активности по IC_{50} (нМ) лучших дочерних клонов и их соответствующих материнских клонов (все в формате scFv)

клон scFv	**Анализ C3 с 1% человеческой сывороткой (IC_{50} нМ)**	**Анализ C3 с 90% человеческой сывороткой (IC_{50} нМ)**	**Анализ C4 с 90% человеческой сывороткой (IC_{50} нМ)**
17D20mc	38	ND	ND

17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	ND	ND
17N16m_d17N9	48	15	230

Ниже представлены последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) для материнских клонов и дочерних клонов, показанных выше в ТАБЛИЦЕ 8.

CDR-области Кэбата (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) выделены жирным шрифтом; и CDR-области Чотиа (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3)) подчеркнуты.

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) 17D20_35VH-21N11VL (SEQ ID NO:67, кодируемая SEQ ID NO:66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS**RG**K**MG**VSWIRQPPGKALEW**LA**H**IF SSDEKSYRTSL**KSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAT**YYCARIRRGGIDY**WGQG TLVTVSS

d17N9 вариабельная область тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO:68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVS**ST**S**AA**WNWIRQSPSRGLEW**LGRTY YRSKWYNDYAV**SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT**AVYYCARDPFGVPFDI**WG QGTMVTVSS

Ниже представлены последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) для материнских клонов и дочерних клонов, показанных выше в ТАБЛИЦЕ 8.

CDR-области Кэбата (24-34 (L1); 50-56 (L2); и 89-97 (L3) выделены жирным шрифтом; и CDR-области Чотиа (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3) подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми независимо от того, как они пронумерованы, по системе Кэбата или Чотиа.

17D20m_d3521N11 вариабельная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO:69, кодируется SEQ ID NO:70)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYW**YQQKPGQSPVLVMYQ**DKQR PSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAVF**GGGTKLTVL

17N16m_d17N9 вариабельная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO:71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHW**YQQRPGQAPVLVIYD**DSDRP SG**IPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGTKLTVLAAAG SEQKLISE

Антитела к MASP-2 OMS100 и MoAb_d3521N11VL (включающие вариабельную область тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO:69, также называемые "OMS646" и "mAb6"), которые, как было продемонстрировано, оба связываются с MASP-2 человека с высокой аффинностью и обладают способностью блокировать функциональную активность комплемента, были проанализированы на предмет связывания с эпитопами с помощью дот-блот анализа. Результаты показывают, что антитела OMS646 и PMS100 обладают высокой специфичностью в отношении MASP-2 и не связываются с MASP-1/3. Ни одно из антител не связывалось ни с MAp19, ни с фрагментами MASP-2, которые не содержали

CCP1 домен MASP-2, что приводит к выводу, что участки связывания охватывают CCP1.

Было определено, что антитело к MASP-2 OMS646 с высокой авидностью связывается с рекомбинантным MASP-2 (Kd 60-250 пМ) с >5000-кратной селективностью по сравнению с C1s, C1r или MASP-1 (см. ТАБЛИЦУ 9 ниже):

ТАБЛИЦА 9: Аффинность и специфичность взаимодействия антитела к MASP-2 OMS646 с MASP-2 согласно оценке с помощью исследования методом твердофазного ИФА

Антиген	Kd (пМ)
MASP-1	>500000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500000
Очищенный C1r человека	>500000
Очищенный C1s человека	~500000

*Среднее±SD; n=12

OMS646 специфично блокирует зависимую лектином активацию предельных дополнительных компонентов

Методы:

Влияние OMS646 на отложение мембраноатакующего комплекса (МАК) исследовали при использовании условий, специфических для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели использовали набор для скрининга комплемента Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты:

На ФИГУРЕ 12A графически проиллюстрирован уровень отложения МАК в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для лектинового пути. На ФИГУРЕ 12B графически проиллюстрирован уровень отложения МАК в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для классического пути. На ФИГУРЕ 12C графически проиллюстрирован уровень отложения МАК в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для альтернативного пути.

Как показано на ФИГУРЕ 12A, OMS646 блокирует опосредованную лектиновым путем активацию отложения МАК со значением IC_{50} примерно 1 нМ. Однако OMS646 не оказывал влияния на отложение МАК, вызванное активацией, опосредованной классическим путем (ФИГУРА 12B), или активацией, опосредованной альтернативным путем (ФИГУРА 12C).

Фармакокинетика и фармакодинамика OMS646 после внутривенного (в/в) или подкожного (п/к) введения мышам

Фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД) OMS646 оценивали в 28-

дневном исследовании ФК/ФД с введение однократной дозы на мышах. В исследовании тестировали уровни доз 5 мг/кг и 15 мг/кг OMS646, вводимого подкожно (п/к), а также уровень дозы 5 мг/кг OMS646, вводимого внутривенно (в/в).

Что касается фармакокинетического профиля OMS646, на ФИГУРЕ 13 графически проиллюстрирована концентрация OMS646 (среднее значение для n=3 животных/группа) в зависимости от времени после введения OMS646 в указанной дозе. Как показано на ФИГУРЕ 13, при подкожной дозе 5 мг/кг, OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 5-6 мкг/мл приблизительно через 1-2 дня после введения дозы. Биодоступность OMS646 при подкожной дозе 5 мг/кг составила примерно 60%. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 13, при подкожной дозе 15 мг/кг, OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 10-12 мкг/мл примерно через 1-2 дня после введения дозы. Во всех группах OMS646 медленно выводилось из системного кровотока с периодом полувыведения в конечной фазе приблизительно 8-10 дней. Профиль OMS646 является типичным для человеческих антител у мышей.

ФД активность OMS646 графически проиллюстрирована на ФИГУРАХ 14A и 14B. На ФИГУРАХ 14A и 14B показан ФД ответ (снижение системной активности лектинового пути) у каждой мыши в группах введения 5 мг/кг внутривенно (ФИГУРА 14A) и 5 мг/кг подкожно (ФИГУРА 14B). Пунктирная линия указывает на исходный уровень анализа (максимальное ингибирование; сыворотка интактных мышей с добавкой in vitro избытка OMS646 перед анализом). Как показано на ФИГУРЕ 14A, после внутривенного введения 5 мг/кг OMS646 системная активность лектинового пути сразу же снижалась почти до не поддающихся обнаружению уровней, при этом активность лектинового пути показала лишь умеренное восстановление в течение 28-дневного периода наблюдения. Как показано на ФИГУРЕ 14B, у мышей, которым вводили 5 мг/кг OMS646 п/к, наблюдали зависимое от времени ингибирование активности лектинового пути. Активность лектинового пути снижалась до почти не поддающихся обнаружению уровней в течение 24 часов после введения лекарственного средства и оставалась на низком уровне в течение по меньшей мере 7 дней. Активность лектинового пути постепенно повышалась с течением временем, но не возвращалась к уровням до введения дозы в течение 28-дневного периода наблюдения. Профиль активности лектинового пути в зависимости от времени, наблюдаемый после подкожного введения 15 мг/кг, был аналогичен п/к дозе 5 мг/кг (данные не показаны), что указывает на насыщение конечной ФД точки. Данные также показали, что еженедельно вводимые дозы 5 мг/кг OMS646, вводимые либо в/в, либо п/к, достаточны для достижения постоянного подавления системной активности лектинового пути у мышей.

ПРИМЕР 13

В данном примере описано создание рекомбинантных антител, ингибирующих MASP-2, содержащих вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую одну или несколько CDR, которые специфически связываются с MASP-2, и по меньшей мере одну коровую последовательность пептида SGMI (также называемого

SGMI-пептид, несущий антитело к MASP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент).

Теоретические основы/обоснование:

Создание специфических ингибиторов MASP-2, называемых SGMI-2, описано в публикациях Heja et al., J Biol Chem 287:20290 (2012) и Heja et al., PNAS 109:10498 (2012), которые включены в настоящий документ посредством отсылки. SGMI-2 представляет собой пептид из 36 аминокислот, который был отобран из фаговой библиотеки вариантов ингибитора протеазы 2 из Schistocerca gregaria, в котором шесть из восьми положений связывающей протеазу петли были полностью рандомизированы. Последующая эволюция in vitro дала моноспецифические ингибиторы с одноразрядными значениями K_I в нМ (Heja et al., J. Biol. Chem. 287:20290, 2012). Структурные исследования показали, что оптимизированная связывающая протеазу петля образует первичный участок связывания, определяющий специфичность двух ингибиторов. Аминокислотные последовательности расширенных вторичных и внутренних областей связывания являются общими для двух ингибиторов и вносят вклад в образование контактного интерфейса (Heja et al., 2012. J. Biol. Chem. 287:20290). Что касается механизма действия, SGMI-2 блокирует лектиновый путь активации комплемента, не затрагивая классический путь (Heja et al., 2012. Proc. Natl. Acad. Sci. 109:10498).

Аминокислотные последовательности ингибиторов SGMI-2 представлены ниже:

Полноразмерный SGMI-2: (SEQ ID NO:72)	LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ
Среднеразмерный SGMI-2: (SEQ ID NO:73)	TCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ
Короткий SGMI-2: (SEQ ID NO:74)	TCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ

Как описано в этом Примере, а также описано в WO 2014/144542, несущие SGMI-2 пептид антитела к MASP-2 и их фрагменты были созданы путем слияния аминокислотной последовательности пептида SGMI-2 (например, SEQ ID NO: 72, 73 или 74) на N- или C-концах тяжелых и/или легких цепей антитела к MASP-2 человека. Антитела и фрагменты MASP-2, несущие пептид SGMI-2, обладают повышенной ингибирующей активностью по сравнению с голым каркасным антителом к MASP-2, которое не содержит последовательность пептида SGMI-2, при измерении в анализе отложения C3b или C4b с использованием человеческой сыворотки, как описано в WO 2014/144542, а также обладают повышенной ингибирующей активностью по сравнению с голым каркасным антителом к MASP-2 при измерении в модели на мышах in vivo. Способы получения несущих пептид SGMI-2 антител к MASP-2 описаны ниже.

Методы:

Были созданы экспрессионные конструкции, кодирующие четыре иллюстративных антитела к MASP-2, несущих пептид SGMI-2, в которых пептид SGMI-2 был слит либо с N-, либо с C-концом тяжелой или легкой цепи репрезентативного MASP-2-

ингибирующего антитела, OMS646 (созданного, как описано в Примере 12).

ТАБЛИЦА 10: Слитые конструкции MASP-2 антитела/SGMI-2

Название антитела	Расположение пептида на антителе				SEQ ID NO:
	H-N	H-C	L-N	L-C	
HL-M2 (голое OMS646 против MASP-2)	-	-	-	-	67+70
H-M2-SGMI-2-N	SGMI-2	-	-	-	75+70
H-M2-SGMI-2-C	-	SGMI-2	-	-	76+70
L-M2-SGMI-2-N	-	-	SGMI-2	-	67+77
L-M2-SGMI-2-C	-	-	-	SGMI-2	67+78

Сокращения в Таблице 10:
"H-N"=N-конец тяжелой цепи
"H-C"=C-конец тяжелой цепи
"L-N"=N-конец легкой цепи
"L-C"=C-конец легкой цепи
"M2"=каркас Ат к MASP-2 (репрезентативное OMS646)

Для N-концевых слитых конструкций, показанных в ТАБЛИЦЕ 10, пептидный линкер ('GTGGGSGSSS' SEQ ID NO: 79) добавляли между пептидом SGMI-2 и вариабельной областью.

Для C-концевых слитых конструкций, показанных в ТАБЛИЦЕ 10, пептидный линкер ('AAGGSG' SEQ ID NO: 80) добавляли между константной областью и пептидом SGMI-2, а второй пептид "GSGA" (SEQ ID NO: 81) добавляли на C-конец слитого полипептида для защиты C-концевых пептидов SGMI-2 от расщепления.

Аминокислотные последовательности следующих репрезентативных слитых конструкций MASP-2 антитела/SGMI-2 представлены ниже:

H-M2ab6-SGMI-2-N (SEQ ID NO:75, кодируемое SEQ ID NO:82):

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQVTLKESG
PVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSR
LTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[491 ак белок, ак 1-36=SGMI-2 (подчеркнут), ак 37-46=линкер (выделен курсивом); ак 47-164=вариабельная область тяжелой цепи MASP-2 ab#6 (подчеркнута); ак 165-491=константная область IgG4 с мутацией в шарнирной области].

H-M2ab6-SGMI-2-C (SEQ ID NO:76, кодируемое SEQ ID NO:83):

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
SDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTL

VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAAGGSGLEVTCEPGTTFKDKCNT
CRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[491 ак белок, ак 1-118=вариабельная область тяжелой цепи MASP-2 ab#6 (подчеркнута); ак 119-445=константная область IgG4 с мутацией в шарнирной области; ак 446-451=первый линкер (выделен курсивом); ак 452-487=SGMI-2; ак 488-491=второй линкер (выделен курсивом)].

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

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQPVLTQPPS
LSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRPSGIPERFSGSNSGN
TATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[258 ак белок, ак 1-36=SGMI-2 (подчеркнуты); ак 37-46=линкер (выделен курсивом); ак 47-152=вариабельная область легкой цепи MASP-2 ab#6 (подчеркнута); ак 153-258=константная область лямбда Ig человека]

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

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAP
SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSAAGGSGLEVTCEPGTTFKD
KCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[258 ак белок, ак 1-106=вариабельная область легкой цепи MASP-2 ab#6 (подчеркнута); ак 107-212= константная область лямбда Ig человека; ак 213-218=первый линкер; ак 219-254=SGMI-2; ак 255-258=второй линкер].

Функциональные анализы:

Четыре конструкции слитых антител MASP-2-SGMI-2 транзиентно экспрессировали в клетках Expi293F (Invitrogen), очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А и тестировали в 10% нормальной человеческой сыворотке на ингибирование отложения C3b в анализе с покрытыми маннаном гранулами, как описано ниже.

Тестирование слитых конструкций MASP-2-SGMI-2 в анализе с покрытыми маннаном гранулами на отложение C3b

Слитые антитела MASP-2-SGMI-2 оценивали на предмет ингибирования лектинового пути в анализе отложения C3b на покрытых маннаном гранулах. Этот анализ, который позволяет определять степень активности с помощью проточной цитометрии,

обеспечивает более высокое разрешение, чем анализ Wieslab®. Анализ лектинового пути с ипсользованием гранул проводили следующим образом: маннан адсорбировали на полистирольных гранулах диаметром 7 мкМ (Bangs Laboratories; Fishers, IN, USA) в течение ночи при 4°C в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Гранулы промывали в PBS и подвергали контакту с 10% человеческой сывороткой или 10% сывороткой, предварительно инкубированной с антителами или ингибиторами. Смесь сыворотки и гранул инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа при перемешивании. После инкубирования с сывороткой, гранулы промывали и измеряли отложение C3b на гранулах путем детектирования с использованием кроличьего поликлонального антитела против C3c (Dako North America; Carpinteria, CA, USA) и вторичного PE-Cy5-конъюгированного козьего антитела против иммуноглобулинов кролика (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA). После процедуры окрашивания гранулы анализировали с использованием проточного цитометра FACSCalibur. Гранулы гейтировали в виде однородной популяции при использовании прямого и бокового светорассеяния, при этом отложение C3b наблюдали в виде FL3-положительных частиц (FL-3 или "канал FL-3" указывает 3-й или красный канал на цитометре). Среднегеометрическую интенсивность флуоресценции (MFI) популяции для каждого экспериментального условия наносили на график в зависимости от концентрации антитела/ингибитора для оценки ингибирования лектинового пути.

Значения IC_{50} вычисляли при использовании программы GraphPad PRISM. В частности, значения IC_{50} были получены путем применения переменного наклона (четырехпараметрического), нелинейной аппроксимации логарифма (антитело) в сравнении со средней интенсивностью флуоресценции на кривых, полученных в результате цитометрического анализа.

Результаты представлены в ТАБЛИЦЕ 11.

ТАБЛИЦА 11: Отложение C3b (анализ с покрытыми маннаном гранулами) в 10% человеческой сыворотке

Конструкция	**IC_{50} (нМ)**
Голое N2 Ат (мАт #6)	≥3,63 нМ
H-M2-SGMI-2-N	2,11 нМ
L-M2-SGMI-2-C	1,99 нМ
H-M2-SGMI-2-N	2,24 нМ
L-M2-SGMI-2-N	3,71 нМ

Результаты:

Контрольное, не содержащее SGMI, "голое" каркасное антитело к MASP-2 (мАт #6), в этом анализе демонстрировало ингибирование со значением IC50 ≥3,63 нМ, что согласуется с результатами ингибирования, наблюдаемыми в Примере 12. Примечательно,

что, как показано в ТАБЛИЦЕ 11, все слитые антитела SGMI-2-MASP-2, которые были протестированы, превосходили по активности каркасное антитело к MASP-2 в этом анализе, что позволяет предположить, что повышенная валентность также может способствовать ингибированию отложения C3b.

Тестирование слитых конструкций MASP-2-SGMI-2 в анализе с покрытыми маннаном гранулами для анализа отложения C4b с 10% человеческой сывороткой

Анализ отложения C4b проводили с 10% человеческой сывороткой при использовании таких же условий анализа, как описанные выше для анализа отложения C3b, со следующими модификациями. Обнаружение C4b и проточный цитометрический анализ проводили путем окрашивания реакции отложения мышиным моноклональным антителом против C4b (1:500, Quidel) и окрашивания вторичным козьим PE-Cy5-конъюгатом против мышиного F(ab')2 (1:200, Southern Biotech) перед проточным цитометрическим анализом.

Результаты:

SGMI-2-несущие MASP-2 N-концевые слитые антитела (H-M2-SGMI-2-N: IC50=0,34 нМ), L-M2-SGMI-2-N: IC50=0,41 нМ)) обладали повышенной активностью по сравнению с каркасным антителом к MASP-2 (HL-M2: IC50=0,78 нМ).

Аналогичным образом, несущие один SGMI-2 C-концевые слитые антитела к MASP-2 (H-M2-SGMI-2-C: IC50=0,45 нМ и L-M2-SGMI-2C: IC50=0,47 нМ) обладали повышенной эффективностью по сравнению с каркасным антителом к MASP-2 (HL-M2: IC50=1,2 нМ).

Тестирование слитых конструкций MASP-2-SGMI-2 в анализе с покрытыми маннаном гранулами на отложение C3b с 10% мышиной сывороткой.

Анализ с покрытыми маннаном гранулами на отложение C3b проводили, как описано выше, с 10% мышиной сывороткой. Подобно результатам, наблюдаемым в человеческой сыворотке, было установлено, что несущие SGMI-2, слитые конструкции против MASP-2 обладали повышенной эффективностью по сравнению с каркасным антителом к MASP-2 в мышиной сыворотке.

Обзор результатов: результаты в данном примере демонстрируют, что все протестированные слитые SGMI-2-MASP-2 антитела обладали повышенной активностью по сравнению с каркасным антителом к MASP-2.

ПРИМЕР 14

В данном примере представлены результаты, полученные при использовании модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника (OOM) у MASP-2 -/- дефицитных и MASP-2 +/+ достаточных мышей для оценки роли лектинового пути при фиброзе почек.

Теоретические основы/обоснование:

Фиброз почек и воспаление являются характерными признаками поздней стадии заболевания почек. Тубулоинтерстициальный фиброз почек представляет собой прогрессирующий процесс, включающий устойчивое повреждение клеток, нарушенное

заживление, активацию резидентных и инфильтрирующих клеток почек, высвобождение цитокинов, воспаление и фенотипическую активацию клеток почек с образованием внеклеточного матрикса. Тубулоинтерстициальный (ТИ) фиброз почек является общей конечной точкой многих патологий почек и представляет собой ключевую мишень для потенциальных методов терапии, направленных на предотвращение прогрессирующего нарушения функции почек при хронической болезни почек (ХБП). ТИ поражение почек тесно связано со снижением функции почек при гломерулярных заболеваниях (Risdon R.A. et al., Lancet 1:363-366, 1968; Schainuck L.I. et al, Hum Pathol 1:631-640, 1970; Nath K.A., Am J Kid Dis 20:1-17, 1992) и характерно для ХБП, когда присутствует накопление миофибробластов, и потенциальное пространство между канальцами и перитубулярными капиллярами заполняется матриксом, состоящим из коллагенов и других протеогликанов. Происхождение ТИ миофибробластов остается достаточно спорным, однако фиброзу обычно предшествует воспаление, характеризующееся первоначально накоплением ТИ Т-лимфоцитов, а затем макрофагов (Liu Y. et al., Nat Rev Nephrol 7:684-696, 2011; Duffield J.S., J Clin Invest 124:2299-2306, 2014).

Модель ООМ на грызунах вызывает прогрессирующий фиброз почек, отличительный признак прогрессирующего заболевания почек практически любой этиологии (Chevalier et al., Kidney International 75:1145-1152, 2009). Сообщалось, что экспрессия гена C3 была повышена у мышей дикого типа после ООМ, и что отложение коллагена было значительно снижено у C3-/- нокаутных мышей после ООМ по сравнению с мышами дикого типа, что указывает на роль активации комплемента при фиброзе почек (Fearn et al., Mol Immunol 48:1666-1733, 2011). Также сообщалось, что дефицит C5 приводил к значительному уменьшению основных компонентов фиброза почек в модели тубулоинтерстициального повреждения (Boor P. et al., J of Am Soc of Nephrology: 18:1508-1515, 2007). Однако до описанного в настоящем документе исследования, проведенного авторами настоящего изобретения, конкретные компоненты комплемента, участвующие в фиброзе почек, не были четко установлены. Поэтому было проведено следующее исследование для оценки MASP-2 (-/-) и MASP-2 (+/+) самцов мышей в модели односторонней обструкции мочеточника (ООМ).

Методы:

Мышь MASP-2-/- получали, как описано в Примере 1, и подвергали обратному скрещиванию в течение 10 поколений с C57BL/6. Самцов мышей C57BL/6 дикого типа (WT) и гомозиготных мышей с дефицитом MASP-2 (MASP-2-/-) на фоне C57BL/6 содержали в стандартных условиях с циклом дня/ночи 12/12, питанием стандартными кормовыми гранулами и свободным доступом к еде и воде. Мышам возрастом десять недель, по 6 в группе, делали анестезию 2,5% изофлураном в кислороде со скоростью 1,5 л/мин. Правые мочеточники двух групп десятинедельных самцов мышей C56/BL6, мышей дикого типа и MASP-2-/- хирургически лигировали. Правую почку обнажали через боковой разрез длиной 1 см. Правый мочеточник полностью перекрывали в двух точках полиглактиновой нитью 6/0. Анальгезию бупренорфином проводили периоперационно

каждые 12 часов, до 5 доз, в зависимости от оценки боли. Во время операции однократно вводили местный анестетик бупивакаин.

Мышей умерщвляли через 7 дней после операции, ткани почек собирали, фиксировали и заключали в парафиновые блоки. Кровь мышей собирали путем пункции сердца под анестезией и умерщвляли мышей обескровливанием после нефрэктомии. Крови позволяли свернуться на льду в течение 2 часов, отделяли сыворотку центрифугированием и хранили замороженной в виде аликвот при -80°C.

Иммуногистохимия ткани почки

Для измерения степени фиброза почек, определяемой отложением коллагена, залитые в парафин срезы почек толщиной 5 микрон, окрашивали пикросириусом красным, коллаген-специфичным красителем, как описано в Whittaker P. et al., Basic Res Cardiol 89:397-410, 1994. В кратком изложении, срезы почек депарафинировали, регидратировали и окрашивали на коллаген в течение 1 часа водным раствором пикросириуса красного (0,5 г Сириуса красного, Sigma, Dorset UK) в 500 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты. Предметные стекла два раза промывали подкисленной водой (0,5% ледяной уксусной кислоты в дистиллированной воде) по 5 минут, затем обезвоживали и заключали в среду.

Для измерения степени воспаления, определяемой инфильтрацией макрофагов, срезы почек окрашивали специфичным к макрофагам антителом F4/80 следующим образом. Фиксированные формалином, залитые в парафин срезы почек толщиной 5 микрон депарафинизировали и регидратировали. Выделение антигена проводили в цитратном буфере при 95°C в течение 20 минут с последующим гашением эндогенной пероксидазной активности при инкубировании в 3% H_2O_2 в течение 10 минут. Срезы тканей инкубировали в блокирующем буфере (10% термоинактивированная нормальная козья сыворотка с 1% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (PBS)) в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим блокированием авидином/биотином. Срезы тканей промывали в PBS три раза по 5 минут после каждого этапа. Первичное антитело к F4/80 макрофагов (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), разведенное 1:100 в блокирующем буфере, наносили на 1 час. Затем на 30 минут наносили биотинилированное козье вторичное антитело против иммуноглобулина крысы, разведенное 1:200, а затем конъюгированный фермент пероксидазу хрена (HRP) на 30 минут. Окрашивание проявляли с использованием субстрата диаминобензидина (DAB) (Vector Labs, Peterborough UK) в течение 10 минут, и предметные стекла промывали водой, обезвоживали и заливали средой без контрастного окрашивания для облегчения компьютерного анализа.

Анализ изображений

Процент окрашивания коркового вещества почек определяли, как описано в Furness P.N. et al., J Clin Pathol 50:118-122, 1997. В кратком изложении, 24-битные цветные изображения были получены из последовательных неперекрывающихся полей коркового вещества почек непосредственно под капсулой почки по всей периферии

разреза почки. После захвата каждого изображения изображение NIH использовали для извлечения красного канала в виде 8-битного монохромного изображения. Неравномерность фонового освещения вычитали с использованием предварительно записанного изображения освещенного поля микроскопа без установленного среза. Изображение подвергали фиксированному порогу для идентификации областей изображения, соответствующих положительности окрашивания. Затем вычисляли процент черных пикселей, и после того, как все изображения вокруг почки были измерены таким образом, регистрировали средний процент, с получением значения, соответствующего проценту окрашенной области на срезе почки.

Анализ экспрессии генов

Экспрессию нескольких генов, связанных с воспалением и фиброзом почек у мышей, измеряли с помощью количественной ПЦР (кПЦР) следующим образом. Суммарную РНК выделяли из коркового вещества почки с использованием Trizol® (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенную РНК обрабатывали набором Turbo DNA-free (ThermoFisher Scientific) для устранения примесей ДНК, после чего синтезировали первую цепь кДНК с использованием системы обратной транскрипции AMV (Promega, Madison, WI, USA). Целостность кДНК подтверждали с помощью одной реакцией кПЦР при использовании анализа TaqMan GAPDH (Applied Biosystems, Paisley, UK) с последующей реакцией кПЦР с использованием 96-луночных планшетов Custom TaqMan Array (Life Technologies, Paisley, UK).

В этом анализе были исследованы двенадцать генов:

Коллаген типа IV альфа 1 (col4α1; ID анализа: Mm01210125_m1)

Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFβ-1; ID анализа: Mm01178820_m1);

Кадгерин 1 (Cdh1; ID анализа: Mm01247357_m1);

Фибронектин 1 (Fn1; ID анализа: Mm01256744_m1);

Интерлейкин 6 (IL6; ID анализа Mm00446191_m1);

Интерлейкин 10 (IL10; ID анализа Mm00439614_m1);

Интерлейкин 12a (IL12a; ID анализа Mm00434165_m1);

Виментин (Vim; ID анализа Mm01333430_m1);

Актинин альфа 1 (Actn1; ID анализа Mm01304398_m1);

Фактор некроза опухоли-α (ФНО-α; ID анализа Mm00443260_g1)

Компонент комплемента 3 (C3; ID анализа Mm00437838_m1);

Гамма-интерферон (Ifn-γ; ID анализа Mm01168134)

Были использованы следующие контрольные гены домашнего хозяйства:

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH; ID анализа Mm99999915_g1);

Глюкуронидаза бета (Gusβ; ID анализа Mm00446953_m1);

Эукариотическая 18S рРНК (18S; ID анализа Hs99999901_s1);

Гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HPRT; ID анализа Mm00446968_m1)

Реакции объемом по двадцать мкл амплифицировали с использованием TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems) в течение 40 циклов. Данные ПЦР в реальном времени обрабатывали при использовании программы Applied Biosystems 7000 SDS v1.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

После односторонней обструкции мочеточника (ООМ) непроходимые почки подвергаются притоку воспалительных клеток, в частности макрофагов, с последующим быстрым развитием фиброза, на который указывает накопление коллагена наряду с дилатацией канальцев и ослаблением эпителия проксимальных канальцев (см. Chevalier R. L. et al. ., Kidney Int 75:1145-1152, 2009).

На ФИГУРЕ 15 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных Сириусом красным, где срезы ткани были получены от мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника (ООМ) или от ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на ФИГУРЕ 15, срезы почек мышей дикого типа через 7 дней после обструкции мочеточника показали значительно большее отложение коллагена по сравнению с мышами MASP-2-/- (значение p=0,0096). Средние значения±стандартная ошибка средних значений для оперированных мышей с ООМ в группах животных дикого типа и MASP-2-/- составили 24,79±1,908 (n=6) и 16,58±1,3 (n=6) соответственно. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 15, срезы тканей ложнооперированных контрольных мышей дикого типа и ложнооперированных контрольных мышей MASP-2-/- показали очень низкие уровни окрашивания коллагена, как и ожидалось.

На ФИГУРЕ 16 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, где срезы ткани были получены у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника или у ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на ФИГУРЕ 16, по сравнению с мышами дикого типа ткань, полученная из почек с ООМ мышей MASP-2-/-, демонстрировала значительно меньшую инфильтрацию макрофагов через 7 дней после обструкции мочеточника (% площади окрашенных макрофагов в WT: 2,23±0,4 в сравнении с MASP-2-/-: 0,53±0,06, p=0,0035). Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 16, срезы тканей ложнооперированных мышей дикого типа и ложнооперированных мышей MASP-2-/- не показали поддающегося обнаружению окрашивания макрофагов.

Анализ экспрессии различных генов, связанных с воспалением и фиброзом почек, проводили в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника и у ложнооперированных мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей. Данные, показанные на ФИГУРАХ 17-20, представляют собой Log10 относительного количественного определения по отношению к образцу ложнооперированного животного дикого типа, а столбцы представляют собой стандартную ошибку средних значений. Что касается результатов анализа экспрессии

генов, связанных с фиброзом, на ФИГУРЕ 17 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК коллагена типа IV альфа 1 (коллагена-4), измеренные с помощью кПЦР в срезах ткани почек, полученных у животных дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника и у ложнооперированных контрольных мышей. На ФИГУРЕ 18 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК трансформирующего фактора роста бета-1 (TGFβ-1), измеренные с помощью кПЦР в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника и у ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на ФИГУРАХ 17 и 18, непроходимые почки мышей дикого типа продемонстрировали значительно повышенную экспрессию генов, связанных с фиброзом, коллагена типа IV (ФИГУРА 17) и TGFβ-1 (ФИГУРА 18) по сравнению с ложнооперированными почками у мышей дикого типа, что демонстрирует то, что эти гены, связанные с фиброзом, индуцируются после повреждения при ООМ у мышей дикого типа, как и ожидалось. Напротив, как дополнительно показано на ФИГУРАХ 17 и 18, непроходимые почки MASP-2-/-, подвергнутые повреждению ООМ, демонстрировали значительное снижение экспрессии коллагена типа IV (ФИГУРА 17, p=0,0388) и значительное снижение экспрессии TGFβ-1 (ФИГУРА 18, p=0,0174) по сравнению с мышами дикого типа, подвергшимися повреждению при ООМ.

Что касается результатов анализа экспрессии генов, связанных с воспалением, на ФИГУРЕ 19 графически показаны относительные уровни экспрессии мРНК интерлейкина-6 (IL-6), измеренные с помощью кПЦР в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника и у ложнооперированных контрольных мышей. На ФИГУРЕ 20 графически проиллюстрированы относительные уровни экспрессии мРНК интерферона-γ, измеренные с помощью кПЦР в срезах ткани почек, полученных у мышей дикого типа и мышей MASP-2-/- через 7 дней после обструкции мочеточника и у ложнооперированных контрольных мышей. Как показано на ФИГУРАХ 19 и 20, непроходимые почки у мышей дикого типа продемонстрировали значительно повышенную экспрессию связанных с воспалением генов интерлейкина-6 (ФИГУРА 19) и интерферона-γ (ФИГУРА 20) по сравнению с ложнооперированными почками у мышей дикого типа, что демонстрирует то, что эти гены, связанные с воспалением, индуцируются после повреждения при ООМ у мышей дикого типа. Напротив, как дополнительно показано на ФИГУРАХ 19 и 20, непроходимые почки MASP-2-/-, подвергнутые повреждению ООМ, демонстрировали значительное снижение экспрессии интерлейкина-6 (ФИГУРА 19, p=0,0109) и интерферона-γ (ФИГУРА 20, p=0,0182) по сравнению с мышами дикого типа, подвергшимися повреждению при ООМ.

Следует отметить, что экспрессия генов Vim, Actn-1, ФНОα, C3 и IL-10 была значительно повышена в почках при ООМ, полученных как у мышей дикого типа, так и у мышей MASP-2-/-, без значимого различия в уровнях экспрессии этих конкретных генов

между мышами дикого типа и MASP-2-/- (данные не показаны). Уровни экспрессии генов Cdh-1 и IL-12a не изменились в непроходимых почках животных ни в одной из групп (данные не показаны).

Обсуждение:

Как известно, модель ООМ у грызунов вызывает раннее, активное и глубокое повреждение в непроходимой почке со снижением почечного кровотока, интерстициальным воспалением и быстрым фиброзом в течение одной-двух недель после обструкции, и широко используется для понимания общих механизмов и медиаторов воспаления и фиброза в почке (см., например, Chevalier R.L., Kidney Int 75:1145-1152, 2009; Yang H. et al., Drug Discov Today Dis Models, 7:13-19, 2010).

Результаты, описанные в данном Примере, демонстрируют значительное снижение отложения коллагена и инфильтрации макрофагов в оперированных почках с ООМ у мышей MASP-2(-/-) в сравнении с контрольными мышами дикого типа (+/+). Неожиданные результаты, показывающие значительное снижение повреждения почек, как на гистологическом уровне, так и на уровне экспрессии генов у животных MASP-2-/-, демонстрируют, что лектиновый путь активации комплемента вносит значимый вклад в развитие воспаления и фиброза в непроходимой почке. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, считается, что лектиновый путь вносит существенный вклад в патофизиологию фиброзного заболевания в результате инициации и поддерживания провоспалительных стимулов, которые усугубляют патологический цикл, в котором клеточное повреждение вызывает воспаление, которое, в свою очередь, вызывает дальнейшее клеточное повреждение, рубцевание и потерю тканей. С учетом этих результатов ожидается, что ингибирование или блокада MASP-2 под действием ингибитора будет иметь профилактический и/или терапевтический эффект в отношении ингибирования или предотвращения фиброза почек, а также в отношении ингибирования или предотвращения фиброза в общем (т.е. независимо от ткани или органа).

ПРИМЕР 15

В данном примере описан анализ эффективности моноклонального MASP-2-ингибирующего антитела в модели односторонней обструкции мочеточника (ООМ), модели фиброза почек на мышах.

Теоретические основы/обоснование:

Уменьшение тубулоинтерстициального фиброза почек, общей конечной точки многих почечных патологий, представляет собой ключевую цель терапевтических стратегий, направленных на предотвращение прогрессирования заболеваний почек. Принимая во внимание нехватку новых и существующих методов лечения, направлено воздействующих на воспалительные профибротические пути при заболеваниях почек, существует острая необходимость в разработке новых терапий. Многие пациенты с протеинурическим заболеванием почек демонстрируют тубулоинтерстициальное воспаление и прогрессирующий фиброз, что очень близко приближает снижение функции почек. Протеинурия сама по себе вызывает тубулоинтерстициальное воспаление и

развитие протеинурической нефропатии (Brunskill N.J. et al., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004). Независимо от первичного заболевания почек тубулоинтерстициальное воспаление и фиброз неизменно наблюдаются у пациентов с прогрессирующей почечной недостаточностью и тесно связаны со снижением выделительной функции (Risdon R.A. et al., Lancet 1:363-366, 1968; Schainuck L.I., et al., Hum Pathol 1:631-640, 1970). Терапии, способные прерывать выжные общие клеточные пути, ведущие к фиброзу, обещают широкое применение при заболеваниях почек.

Как описано в Примере 14, в ООМ модели непротеинурического фиброза почек было определено, что мыши MASP-2-/- демонстрируют значительно меньший фиброз почек и воспаление по сравнению с контрольными животными дикого типа, на что указывают воспалительные клеточные инфильтраты (75% снижение) и гистологические маркеры фиброза, такие как коллаген (снижение на одну треть), определяя, таким образом, ключевую роль лектинового пути при фиброзе почек.

Как описано в Примере 13, было создано моноклональное антитело к MASP-2 (слитое антитело OMS646-SGMI-2, включающее пептид SGMI-2, слитый с С-концом тяжелой цепи OMS646), которое специфически блокирует функцию лектинового пути у человека и, как было также показано, блокирует лектиновый путь у мышей. В этом примере OMS646-SGMI-2 исследовали в модели ООМ фиброза почек на мышах дикого типа с целью определения, способен ли специфичный ингибитор MASP-2 подавлять фиброз почек.

Методы:

В данном исследовании оценивали эффект MASP-2-ингибирующего антитела (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) в сравнении с человеческим IgG4 антителом изотипического контроля (10 мг/кг ET904) и контрольным растворителем у самцов мышей C57BL/6 дикого типа. Антитела (10 мг/кг) вводили группам из 9 мышей путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции в день 7, 4 и 1 до операции ООМ и снова в день 2 после операции. Образцы крови забирали до введения антител и в конце эксперимента с целью оценки функциональной активности лектинового пути.

Хирургическую операцию ООМ, сбор ткани и окрашивание Сириусом красным и антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, проводили при использовании способов, описанных в Примере 14.

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

Для оценки фармакодинамического эффекта MASP-2-ингибирующего мАт у мышей, активность системного лектинового пути оценивали путем количественного определения лектин-индуцированной активации C3 в минимальных разведениях образцов сыворотки, собранных в указанное время после в/б введения мАт к MASP-2 или контрольного мАт мышам. В кратком изложении: полистирольные микросферы диаметром 7 мкМ (Bangs Laboratories, Fisher, IN, USA) покрывали маннаном при

инкубировании в течение ночи с 30 мкг/мл маннана (Sigma) в натрий-бикарбонатном буфере (pH 9,6), затем промывали, блокировали 1% фетальной бычьей сыворотков в PBS и ресуспендировали в PBS при конечной концентрации 1×10^8 гранул/мл. Реакции отложения комплемента инициировали путем добавления 2,5 мкл покрытых маннаном гранул (~250000 гранул) к 50 мкл минимально разведенных образцов сыворотки мыши (90% конечная концентрация сыворотки) с последующим инкубированием в течение 40 минут при 4°C. После остановки реакции осаждения путем добавления 250 мкл охлажденного во льду буфера для проточной цитометрии (FB: PBS, содержащий 0,1% фетальной бычьей сыворотки), гранулы собирали с помощью центрифугирования и еще два раза промывали 300 мкл охлажденного во льду FB.

Для количественной оценки лектин-индуцированной активации C3, гранулы инкубировали в течение 1 часа при 4°C с 50 мкл кроличьего антитела против C3c человека (Dako, Carpenteria, CA, USA), разведенного в FB. После двух промывок FB для удаления несвязавшегося материала гранулы инкубировали в течение 30 минут при 4°C с 50 мкл козьего PE-Cy5-конъюгированного антитела против иммуноглобулина кролика (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), разведенного в FB. После двух промывок FB для удаления несвязавшегося материала гранулы ресуспендировали в FB и исследовали с помощью цитометра FACS Calibur. Гранулы гейтировали как однородную популяцию при использовании прямого и бокового светорассеяния, и отложение C3b в каждом образце определяли количественно как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Результаты:

Оценка отложения коллагена:

На ФИГУРЕ 21 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных Сириусом красным, где срезы ткани были получены через 7 дней после обструкции мочеточника у мышей дикого типа, получавших либо MASP-2-ингибирующее антитело, либо антитело изотипического контроля. Как показано на ФИГУРЕ 21, срезы ткани почек, собранные через 7 дней после обструкции (OOM), полученные у мышей дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, показали значимое снижение ($p=0,0477$) отложения коллагена по сравнению с количеством отложения коллагена в срезах ткани из непроходимых почек, полученных у мышей дикого типа, получавших IgG4 изотипического контроля.

Оценка содержания гидроксипролина:

Гидроксипролин измеряли в тканях почек как показатель содержания коллагена. Гидроксипролин является параметром, который в высокой степени указывает на патофизиологическое прогрессирование заболевания, индуцированное в этой модели.

На ФИГУРЕ 22 графически проиллюстрировано содержание гидроксипролина в почках, собранных через 7 дней после обструкции (OOM) у мышей дикого типа, получавших либо MASP-2-ингибирующее антитело, либо антитело изотипического контроля. Как показано на ФИГУРЕ 22, ткани непроходимых почек мышей, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, демонстрировали значительно меньшее содержание

гидроксипролина, индикатора содержания коллагена, чем почки мышей, получавших IgG4 мАт изотипического контроля (p=0,0439).

Оценка воспаления:

Непроходимые почки животных дикого типа, получавших антитело изотипического контроля, и животных дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, демонстрировали активную инфильтрацию макрофагов. Тщательная количественная оценка не показала значимого различия в процентах площади окрашивания макрофагов между этими двумя группами (данные не показаны). Впрочем, несмотря на эквивалентное количество инфильтрирующих макрофагов, непроходимые почки животных, которым вводили MASP-2-ингибирующее антитело, демонстрировали значительно менее выраженный фиброз, судя по окрашиванию Сириусом красным, по сравнению с непроходимыми почками у животных, которым вводили изотипический контроль, причем этот результат согласуется с теми результатами, согласно которым ткани непроходимых почек мышей, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, содержали значительно меньше гидроксипролина, чем почки после введения IgG4 мАт изотипического контроля.

Обсуждение

Результаты, описанные в этом примере, демонстрируют, что применение MASP-2-ингибирующего антитела обеспечивает защиту от фиброза почек в модели ООМ, что согласуется с результатами, описанными в Примере 14, демонстрирующими, что у мышей MASP-2-/- значительно снижены фиброз и воспаление почек в модели ООМ по сравнению с мышами дикого типа. Результаты в этом Примере демонстрируют уменьшение фиброза у мышей, получавших MASP-2-ингибирующее антитело. Обнаружение уменьшения фиброза в почках ООМ у животных со снижением или блокадой активности MASP-2-зависимого лектинового пути представляется крайне важным новым открытием. Взятые в совокупности, результаты, представленные в Примере 14 и в данном Примере, демонстрируют благоприятный эффект ингибирования MASP-2 на тубулоинтерстициальное воспаление почек, повреждение клеток канальцев, высвобождение профибротических цитокинов и рубцевание. Облегчение фиброза почек остается ключевой целью нефрологических терапевтических средств. Модель ООМ представляет собой тяжелую модель ускоренного фиброза почек, и вмешательство, которое уменьшает фиброз в этой модели, такое как применение MASP-2-ингибирующих антител, со всей вероятности будет применяться для подавления или предотвращения фиброза почек. Результаты модели ООМ, вероятно, могут быть перенесены на заболевание почек, характеризующееся гломерулярным и/или протеинурическим повреждением канальцев.

ПРИМЕР 16

В данном примере представлены результаты, полученные при использовании модели фиброза, воспаления и тубулоинтерстициального повреждения почек вследствие протеинурии, вызванной белковой перегрузкой, у мышей MASP-2-/- и мышей дикого типа

для оценки роли лектинового пути при протеинурической нефропатии.

Теоретические основы/обоснование:

Протеинурия является фактором риска развития фиброза почек и потери выделительной функции почек, независимо от первичного заболевания почек (Tryggvason K. et al., J Intern Med 254:216-224, 2003, Williams M., Am J. Nephrol 25:77-94, 2005). Концепция протеинурической нефропатии описывает токсические эффекты при избыточном поступлении белка в проксимальные канальцы в результате нарушения селективной проницаемости клубочков (Brunskill N.J., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004, Baines R.J., Nature Rev Nephrol 7:177-180, 2011). Это явление, характерное для многих гломерулярных заболеваний, приводит к образованию провоспалительной рубцовой среды в почках и характеризуется изменениями роста клеток проксимальных канальцев, апоптозом, транскрипцией генов и продукцией воспалительных цитокинов вследствие нарушения регуляции сигнальных путей, стимулируемых протеинурической канальцевой жидкостью. Общепризнано, что протеинурическая нефропатия является ключевым фактором прогрессирующего повреждения почек, характерного для различных первичных патологий почек.

Хроническая болезнь почек поражает более 15% взрослого населения в США и ежегодно приводит приблизительно к 750000 смертей во всем мире (Lozano R. et al., Lancet vol 380, Issue 9859:2095-2128, 2012). Протеинурия является индикатором хронической болезни почек, а также фактором, способствующим прогрессированию заболевания. Многие пациенты с протеинурическим заболеванием почек обнаруживают тубулоинтерстициальное воспаление и прогрессирующий фиброз, что очень приближено к снижению почечной функции. Протеинурия как таковая вызывает тубулоинтерстициальное воспаление и развитие протеинурической нефропатии (Brunskill N.J. et al., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004). При протеинурических заболеваниях почек избыточное количество альбумина и других макромолекул фильтруется через клубочки и реабсорбируется эпителиальными клетками проксимальных канальцев. Это вызывает порочный воспалительный цикл, опосредованный активацией комплемента, что приводит к цитокиновым и лейкоцитарным инфильтратам, которые вызывают тубулоинтерстициальное повреждение и фиброз, усугубляя, тем самым, протеинурию и приводя к потере функции почек, и, в конечном итоге, к терминальной стадии почечной недостаточности (см., например, Clark et al., Canadian Medical Association Journal 178:173-175, 2008). Ожидается, что терапия, которая модулирует этот разрушительный цикл воспаления и протеинурии, улучшит результаты при лечении хронической болезни почек.

С учетом благоприятных эффектов ингибирования MASP-2 в ООМ модели тубулоинтерститального повреждения, следующий эксперимент был проведен с целью определения, будет ли ингибирование MASP-2 уменьшать повреждение почек в модели с белковой перегрузкой. В этом исследовании белковую перегрузку использовали для индукции протеинурического заболевания почек, как описано в Ishola et al., European Renal Association 21:591-597, 2006.

Методы:

Мышь MASP-2-/- была получена, как описано в Примере 1, и подвергнута обратному скрещиванию в течение 10 поколений с BALB/c. В текущем исследовании сравнивали результаты мышей дикого типа и MASP-2-/- мышей BALB/c в модели протеинурии с белковой перегрузкой следующим образом.

За неделю до эксперимента мышам проводили одностороннюю нефрэктомию перед провокацией с белковой перегрузкой, чтобы увидеть оптимальный ответ. Используемым средством, вызывающим протеинурию, являлся бычий сывороточный альбумин с низким содержанием эндотоксинов (BSA, Sigma), вводимый в/б в физиологическом растворе мышам WT (n=7) и MASP-2 -/- (n=7) в следующих дозах: по одной дозе 2 мг BSA/г, 4 мг BSA/г, 6 мг BSA/г, 8 мг BSA/ г, 10 мг BSA/г и 12 мг BSA/г массы тела и 9 доз по 15 мг BSA/г массы тела, в общей сложности 15 доз, вводимых в/б в течение 15 дней. Контрольные мыши WT (n=4) и мыши MASP-2-/- (n=4) получали физиологический раствор, вводимый только в/б. После введения последней дозы, животных помещали отдельно в метаболические клетки на 24 часа для сбора мочи. Кровь собирали путем пункции сердца под анестезией, давали крови свернуться на льду в течение 2 часов и отделяли сыворотку с помощью центрифугирования. Образцы сыворотки и мочи собирали в конце эксперимента в день 15, хранили и замораживали для анализа.

Мышей умерщвляли через 24 часа после последнего введения BSA в день 15 и собирали различные ткани для анализа. Почки собирали и обрабатывали для окраски ГЭ и иммуноокрашивания. Иммуногистохимическую окраску проводили следующим образом. Фиксированные в формалине, залитые парафином срезы ткани почек толщиной 5 микрон от каждой мыши депарафинировали и регидратировали. Выделение антигена проводили в цитратном буфере при 95°C в течение 20 минут с последующим инкубированием тканей в 3% H_2O_2 в течение 10 минут. Затем ткани инкубировали в блокирующем буфере (10% сыворотка биологического вида, в котором индуцировали вторичное антитело, и 1% BSA в PBS) с 10% раствором авидина в течение 1 часа при комнатной температуре. Срезы промывали в PBS три раза по 5 минут после каждого этапа. Затем наносили первичное антитело в блокирующем буфере с 10% раствором биотина на 1 час в концентрации 1:100 для антител к F4/80 (Santa Cruz, номер по кат. sc-25830), TGFβ (Santa Cruz, номер по кат. sc-7892), IL-6 (Santa Cruz, номер по кат. sc-1265) и 1:50 для антитела к ФНОα (Santa Cruz, номер по кат. sc-1348). Затем наносили биотинилированные вторичные антитела на 30 минут в концентрации 1:200 для F4/80, TGFβ и IL-6 срезов и 1:100 для среза ФНОα, а затем HRP-конъюгированный фермент еще на 30 минут. Окрашивание проявляли при использовании набора субстрата диаминобензидина (DAB) (Vector labs) в течение 10 минут, и промывали предметные стекла водой, дегидратировали и заливали средой без контрастного окрашивания для облегчения компьютерного анализа изображений. Окрашенные срезы ткани коры почек анализировали путем захвата цифрового изображения с последующей количественной оценкой при использовании программы для

автоматизированного анализа изображений.

Апоптоз оценивали в срезах ткани путем окрашивания методом введения концевой метки дУТФ в разрыв цепи ДНК при использовании терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TUNEL) следующим образом. Апоптозные клетки в срезах почек окрашивали с использованием набора ApopTag® Peroxidase kit (Millipore) следующим образом. Залитые парафином, фиксированные формалином срезы почек каждой мыши депарафинировали, регидратировали, а затем пермеабилизировали для белка с использованием протеиназы K (20 мкг/мл), которую наносили на каждый образец на 15 минут при комнатной температуре. Между этапами образцы промывали в PBS. Активность эндогенной пероксидазы гасили при инкубировании тканей в 3% H_2O_2 в течение 10 минут. Затем ткани инкубировали в уравновешивающем буфере с последующей инкубированием с ферментом TdT в течение 1 часа при 37°C. После промывки останавливающим/промывочным буфером в течение 10 минут, наносили конъюгат против дигоксигненина на 30 минут при комнатной температуре с последующей промывкой. Окрашивание проявляли в наборе субстрата DAB в течение 4 минут с последующей промывкой водой. Ткани контрастно окрашивали гематоксилином и заключали в DBX. Частоту окрашенных методом TUNEL (коричневое окрашивание) апоптотических клеток подсчитывали вручную в последовательно выбранных 20 полях зрения большого увеличения из коркового вещества с помощью оптического микроскопа Leica DBXM.

Результаты:

Оценка протеинурии

Для подтверждения присутствия протеинурии у мышей исследовали общий белок в сыворотке в день 15, и общий белок, выделяемый с мочой, измеряли в образцах мочи, собранных в течение 24-часового периода в день 15 исследования.

На ФИГУРЕ 23 графически проиллюстрированы общее количество сывороточных белков (мг/мл), измеренное в день 15 у контрольных мышей дикого типа (n=2), которые получали только раствор хлорида натрия, у мышей дикого типа, которые получали BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, которые получали BSA (n=6). Как показано на ФИГУРЕ 23, введение BSA повышало уровень общего белка в сыворотке как в группах дикого типа, так и в группах MASP-2-/-, более чем до двухкратной концентрации по сравнению с концентрацией в контрольной группе, получавшей только раствор хлорида натрия, без значимого различия между группами, получавшими лечение.

На ФИГУРЕ 24 графически проиллюстрировано общее количество экскретируемого белка (мг) в моче, собранной в течение 24 часов, в день 15 исследования у контрольных мышей дикого типа (n=2), которые получали только раствор хлорида натрия, у мышей дикого типа, которые получали только BSA (n=6), и у мышей MASP-2-/-, которые получали BSA (n=6). Как показано на ФИГУРЕ 24, в день 15 этого исследования наблюдали примерно шестикратное увеличение общего белка, выделяемого с мочой, в группах, получавших BSA, по сравнению с ложнооперированной контрольной группе,

которая получала только раствор хлорида натрия. Результаты, показанные на ФИГУРАХ 23 и 24, демонстрируют, что модель протеинурии работала, как и ожидалось.

Оценка гистологических изменений в почке

На ФИГУРЕ 25 показаны репрезентативные, окрашенные ГЭ срезы ткани почек, которую собирали в день 15 исследования белковой перегрузки в следующих группах мышей: (панель A) контрольные мыши дикого типа; (панель B) MASP-2-/- контрольные мыши; (панель C) мыши дикого типа, получавшие BSA; и (панель D) MASP-2-/- мыши, получавшие BSA. Как показано на ФИГУРЕ 25, в группе MASP-2-/- с перегрузкой (панель D) наблюдается гораздо более высокая степень сохранности тканей по сравнению с группой дикого типа с перегрузкой (панель C) при том же уровне провокации белковой перегрузкой. Например, капсулы Боумена у мышей дикого типа, получавших BSA (перегрузка), были значительно увеличены (панель C) по сравнению с капсулами Боумена в контрольной группе дикого типа (панель A). В то же время, капсулы Боумена у MASP-2-/- мышей (перегрузка), получавших тот же уровень BSA (панель D), сохраняли морфологию, аналогичную контрольным MASP-2-/- мышам (панель B) и контрольным мышам дикого типа (панель A). Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 25, в проксимальных и дистальных канальцах срезов почек дикого типа накапливались крупные белковые цилиндрические структуры (панель C), которые более крупные и многочисленные при сравнении с MASP-2-/- мышами (панель D).

Также следует отметить, что анализ срезов почек из этого исследования с помощью просвечивающего электронного микроскопа показал, что мыши, получавшие BSA, имели общее повреждение цилиарных краев клеток дистальных и проксимальных канальцев с выходом клеточного содержимого и ядер в просвет канальца. В то же время, ткань сохранялась у MASP-2-/- мышей, получавших BSA.

Оценка инфильтрации макрофагов в почках

Для измерения степени воспаления, как показано инфильтрацией макрофагов, срезы ткани собранных почек также окрашивали антителом, специфичным к белку F4/80 макрофагов, при использовании методов, описанных в Boor et al., J of Am Soc of Nephrology 18:1508-1515, 2007.

На ФИГУРЕ 26 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, показывающие среднюю площадь окрашивания макрофагов (%), где срезы ткани были получены в день 15 исследования белковой перегрузки у контрольных мышей дикого типа (n=2), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=5). Как показано на ФИГУРЕ 26, срезы ткани почек, окрашенные антителом против F4/80 макрофагов, показали, что, хотя обе группы, получавшие BSA, показали значимое увеличение инфильтрации макрофагов в почках (измеряемое как % площади, окрашенной антителом к F4/80) по сравнению с ложнообработанным контролем дикого типа, значимое снижение инфильтрации макрофагов наблюдали в срезах тканей MASP-2-/- мышей, получавших BSA, по сравнению с инфильтрацией макрофагов в срезах

тканей мышей дикого типа, получавших BSA (p-значение=0,0345).

На ФИГУРЕ 27A графически проиллюстрирован анализ на присутствие корреляции между макрофагами и протеинурией у каждой мыши дикого типа (n=6), получавшей BSA, путем нанесения на график общих экскретируемых белков, измеренных в образце суточной мочи, в зависимости от инфильтрации макрофагов (средний % окрашенной площади). Как показано на ФИГУРЕ 27A, большинство образцов из почек дикого типа показали положительную корреляцию между уровнем присутствующей протеинурии и степенью инфильтрации макрофагами.

На ФИГУРЕ 27B графически проиллюстрирован анализ на присутствие корреляции между макрофагами и протеинурией у каждой MASP-2-/- мыши (n=5), получавшей BSA, путем нанесения на график общих экскретируемых белков в образце суточной мочи в зависимости от инфильтрации макрофагов (средний % окрашенной площади). Как показано на ФИГУРЕ 27B, положительная корреляция, наблюдаемая у мышей дикого типа между уровнем протеинурии и степенью инфильтрации макрофагов (показана на ФИГУРЕ 27A), не наблюдалась у MASP-2-/- мышей. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, эти результаты могут указывать на присутствие механизма устранения воспаления при высоких уровнях протеинурии у MASP-2-/- мышей.

Оценка инфильтрации цитокинов

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

На ФИГУРЕ 28 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против TGFβ (измеренные в % площади, окрашенной антителом к TGFβ) у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=5). Как показано на ФИГУРЕ 28, значимое увеличение окрашивания TGFβ наблюдали в группе дикого типа, получавшей BSA (перегрузка), в сравнении с группой MASP-2-/-, получавшей BSA (перегрузка) (p=0,026).

На ФИГУРЕ 29 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных антителом против ФНОα (измеренные в % площади, окрашенной антителом к ФНОα) у мышей дикого типа, получавших BSA (n=4), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=5). Как показано на ФИГУРЕ 29, значимое увеличение окрашивания ФНОα наблюдали в группе дикого типа, обработанной BSA (перегрузка), в сравнении с группой MASP-2-/-, обработанной BSA (перегрузка) (p=0,0303).

На ФИГУРЕ 30 графически проиллюстрированы результаты компьютерного

анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против IL-6 (измеренные в % площади, окрашенной антителом к IL-6) у контрольных мышей дикого типа, контрольных MASP-2-/- мышей, мышей дикого типа, получавших BSA (n=7), и MASP-2-/- мышей, получавших BSA (n=7). Как показано на ФИГУРЕ 30, высоко значимое увеличение окрашивания IL-6 наблюдали в группе дикого типа, получавшей BSA, по сравнению с группой MASP-2-/-, получавшей BSA (p=0,0016).

Оценка апоптоза

Апоптоз оценивали в срезах ткани методом окрашивания при введении концевой метки дУТФ в разрыв цепи ДНК при использовании терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TUNEL), и частоту окрашенных методом TUNEL апоптотических клеток подсчитывали в последовательно выбранных 20 полях большого увеличения (HPF) из коры.

На ФИГУРЕ 31 графически проиллюстрирована частота апоптотических клеток, окрашенных методом TUNEL, подсчитанных в последовательно выбранных 20 полях большого увеличения (HPF) из срезов ткани коркового вещества почек мышей дикого типа (n=1), мышей MASP-2-/- (n=1), мышей дикого типа, получавших BSA (n=6), и мышей MASP-2-/-, получавших BSA (n=7). Как показано на ФИГУРЕ 31, значительно более высокий уровень апоптоза в коре наблюдалась в почках, полученных у мышей дикого типа, получавших BSA, по сравнению с почками, полученными у мышей MASP-2-/-, получавших BSA (p=0,0001). .

Общая оценка результатов и выводы:

Результаты в данном примере демонстрируют, что у мышей MASP-2-/- было снижено повреждение почек в модели белковой перегрузки. Таким образом, ожидается, что MASP-2-ингибирующие средства, такие как MASP-2-ингибирующие антитела, будут ингибировать или предотвращать разрушительный цикл воспаления и протеинурии и улучшать результаты при лечении хронической болезни почек.

ПРИМЕР 17

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

Теоретические основы/обоснование:

Как описано в Примере 16, в модели протеинурии с белковой перегрузкой было определено, что мыши MASP-2-/- демонстрируют значительно лучшие результаты (например, менее выраженные тубулоинтерстициальное повреждение и воспаление почек), чем мыши дикого типа, что предполагает патогенную роль лектинового пути при протеинурической болезни почек.

Как описано в Примере 13, было создано моноклональное MASP-2-ингибирующее антитело (OMS646-SGMI-2), которое специфически блокирует функцию лектинового пути у человека, и было также показано, что оно блокирует лектиновый путь у мышей. В

этом примере MASP-2-ингибирующее антитело, OMS646-SGMI-2, исследовали в модели протеинурии при белковой перегрузке на мышах на предмет эффективности при снижении и/или предотвращении воспаления почек и тубулоинтерстициального повреждения у мышей дикого типа.

Методы:

В данном исследовании оценивали эффект MASP-2-ингибирующего антитела (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) в сравнении с человеческим IgG4 антителом изотипического контроля, ET904 (10 мг/кг), и контролем раствором хлорида натрия.

Аналогично исследованию, описанному в Примере 16, в этом исследовании использовали белковую перегрузку для индукции протеинурического заболевания почек (Ishola et al., European Renal Association 21:591-597, 2006). Протеинурию индуцировали у мышей Balb/c после односторонней нефрэктомии путем ежедневных в/б инъекций в повышаемых дозах (от 2 г/кг до 15 г/кг) бычьего сывороточного альбумина с низким содержанием эндотоксинов (BSA) в течение, в общей сложности, 15 дней, как описано в Примере 16.

Введение антител производили раз в две путем в/б инъекции, начиная за 7 дней до индукции протеинурии, и продолжали в течение всего исследования. Такая схема введения доз была выбрана на основании предыдущих ФК/ФД и фармакологических исследований, демонстрирующих стойкое подавление лектинового пути (данные не показаны). Мышей умерщвляли в день 15, собирали почки и обрабатывали для ГЭ и иммуноокрашивания. Окрашенные срезы ткани коры почек исследовали путем захвата цифрового изображения с последующей количественной оценкой при использовании программы для автоматизированного анализа изображений.

Иммуногистохимическое окрашивание и оценку апоптоза проводили, как описано в Примере 16.

Результаты:

Оценка протеинурии

Для подтверждения присутствия протеинурии у мышей, измеряли общие количество выделяемых с мочой белков в образцах суточной мочи в день 15 (конец эксперимента). Было установлено, что образцы мочи показали в среднем почти шестикратное повышение уровней общего белка в группах, получавших BSA, по сравнению с контрольными группами, не получавшими BSA (данные не показаны), подтверждая протеинурию у мышей, получавших BSA. Значимого различия в уровнях белка между группами, получавшими BSA, не наблюдали.

Оценка гистологических изменений

На ФИГУРЕ 32 показаны репрезентативные окрашенные ГЭ срезы тканей следующих групп мышей в день 15 после введения BSA: (панель A) контрольные мыши дикого типа, получавшие раствор хлорида натрия; (панель B) контрольные мыши, получавшие антитело такого же изотипа; и (панель C) мыши дикого типа, получавшие MASP-2-ингибирующее антитело.

Как показано на ФИГУРЕ 32, присутствует гораздо более высокая степень сохранности тканей в группе, получавшей MASP-2-ингибирующее антитело (панель C), по сравнению с группой дикого типа, получавшей раствор хлорида натрия (панель A) или изотипический контроль (панель B) при таком же уровне белковой перегрузки.

Оценка апоптоза

Апоптоз оценивали в срезах ткани при окрашивании методом введения концевой метки дУТФ в разрыв цепи ДНК при использовании терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TUNEL), и частоту окрашенных методом TUNEL апоптотических клеток подсчитывали в последовательно выбранных 20 полях большого увеличения (HPF) из коры. На ФИГУРЕ 33 графически проиллюстрирована частота апоптотических клеток, окрашенных методом TUNEL, подсчитанных в последовательно выбранных 20 полях большого увеличения (HPF) из срезов ткани коры почек у мышей дикого типа, получавших контрольный раствор хлорида натрия и BSA (n=8), мышей дикого типа, получавших с антитело изотипического контроля и BSA (n=8), и мышей дикого типа, получавших MASP-2-ингибирующее антитело, и BSA (n=7). Как показано на ФИГУРЕ 33, очень значительное снижение скорости апоптоза в коре наблюдали в почках, полученных из группы, получавшей MASP-2-ингибирующие антитела, по сравнению с группой, получавшей раствор хлорида натрия и изотипический контроль (p=0,0002 для контроля раствором хлорида натрия в сравнении с MASP-2-ингибирующим антителом; p=0,0052 для изотипического контроля в сравнении с MASP-2-ингибирующим антителом).

Оценка инфильтрации цитокинов

Интерлейкин 6 (IL-6), трансформирующий фактор роста бета (TGFβ) и фактор некроза опухоли альфа (ФНОα), которые являются провоспалительными цитокинами, которые, как известно, повышены в проксимальных канальцах у мышей дикого типа в модели протеинурии, оценивали в срезах ткани почки, полученных в этом исследовании.

На ФИГУРЕ 34 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани, окрашенных антителом против TGFβ (измеренные в % площади, окрашенной антителом к TGFβ) у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), мышей дикого типа, получавших BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8). Как показано на ФИГУРЕ 34, количественная оценка окрашенной на TGFβ площади показала значимое снижение уровней TGFβ у мышей, получавших MASP-2-ингибирующие антитела, по сравнению с контрольными группами, получавшими раствор хлорида натрия и антитела изотипического контроля (p-значения=0,0324 и 0,0349 соответственно).

На ФИГУРЕ 35 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных антителом против ФНОα (измеренные в % площади, окрашенной антителом к ФНОα) у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей

дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8). Как показано на ФИГУРЕ 35, анализ окрашенных срезов показал значимое снижение уровня ФНОα в группе, получавшей MASP-2-ингибирующее антитело, по сравнению с контрольной группой, получавшей раствор хлорида натрия (p=0,011), а также группой изотипического контроля (p=0,0285).

На ФИГУРЕ 36 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов тканей, окрашенных антителом против IL-6 (измеренные в % площади, окрашенной антителом к IL-6) у мышей дикого типа, получавших BSA и раствор хлорида натрия (n=8), BSA и антитело изотипического контроля (n=7), и мышей дикого типа, получавших BSA и MASP-2-ингибирующее антитело (n=8). Как показано на ФИГУРЕ 36, анализ окрашенных срезов показал значимое снижение уровня IL-6 в группе, получавшей MASP-2-ингибирующие антитела, по сравнению с контрольной группой, получавшей раствор хлорида натрия (p=0,0269), а также группой изотипического контроля (p=0,0445).

Общая оценка результатов и выводы:

Результаты в данном примере демонстрируют, что применение MASP-2-ингибирующего антитела обеспечивает защиту от повреждения почек в модели белковой перегрузки, что согласуется с результатами, описанными в Примере 16, демонстрирующими, что мыши MASP-2-/- имели уменьшенное повреждение почек в модели протеинурии.

ПРИМЕР 18

В данном примере представлены результаты, полученные при использовании адриамицин-индуцированной нефрологической модели фиброза, воспаления и тубулоинтерстициального повреждения почек у MASP-2-/- мышей и мышей дикого типа для оценки роли лектинового пути в адриамицин-индуцированной нефропатии.

Теоретические основы/обоснование:

Адриамицин - антрациклиновый противоопухолевый антибиотик, применяемый для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, включая гематологические злокачественные новообразования, саркомы мягких тканей и многие типы карцином. Адриамицин-индуцированная нефропатия представляет собой хорошо известную модель хронической болезни почек, которая позволила лучше изучить прогрессирование хронической протеинурии (Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011). Тип структурного и функционального повреждения при адриамицин-индуцированной нефропатии очень похож на такое повреждение при хроническом протеинурическом заболевании почек у людей (Pippin et al., American Journal of Renal Physiology 296:F213-29, 2009).

Адриамицин-индуцированная нефропатия характеризуется повреждением подоцитов с последующим гломерулосклерозом, тубулоинтерстициальным воспалением и фиброзом. Во многих исследованиях было показано, что адриамицин-индуцированная нефропатия модулируется как иммунными, так и неиммунными механизмами (Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011). Адриамицин-индуцированная нефропатия имеет

несколько преимуществ как модель заболевания почек. Во-первых, это хорошо воспроизводимая и предсказуемая модель повреждения почек. Это обусловлено тем, что она характеризуется индукцией повреждения почек в течение нескольких дней после введения препарата, что упрощает планирование эксперимента, поскольку время развития повреждения является постоянным. Также это - модель, в которой степень повреждения ткани является тяжелой, но при этом она ассоциирована с допустимой смертностью (<5%) и патологией (снижением веса). Таким образом, из-за тяжести и определенного времени повреждения почек при адриамицин-индуцированной нефропатии эта модель подходит для исследования вмешательств, которые защищают от повреждения почек.

Как описано в Примерах 16 и 17, в модели протеинурии с белковой перегрузкой было определено, что мыши MASP-2-/- и мыши, получавшие MASP-2-ингибирующее антитело, демонстрировали значительно лучшие результаты (например, меньшее тубулоинтерстициальное повреждение и меньшее воспаление почек), чем мыши дикого типа, что указывает на патогенную роль лектинового пути при протеинурическом заболевании почек.

В данном примере мышей MASP-2-/- исследовали в сравнении с мышами дикого типа в адриамицин-индуцированной нефрологической модели (AN) с целью определения, может ли дефицит MASP-2 снижать и/или предотвращать воспаление почек и тубулоинтерстициальное повреждение, вызванное адриамицином.

Методы:

1. Оптимизация дозы и времени

Проводили первоначальный эксперимент с целью определения дозы адриамицина и момента времени, в который у мышей BALB/c развивается уровень почечного воспаления, подходящий для исследования терапевтического вмешательства.

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

Результаты. У всех мышей в трех группах были обнаружены признаки гломерулосклероза и протеинурии, определенные при окрашивании ГЭ, с постепенно нарастающей степенью воспаления тканей, измеряемой по инфильтрации макрофагов в почках (данные не показаны). Степень повреждения тканей была легкой в группе одной недели, средней в группе двух недель и тяжелой в группе четырех недель (данные не показаны). Для остальной части исследования была выбрана двухнедельная временная точка.

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

Для определения роли лектинового пути комплемента в адриамицин-индуцированной нефрологии, группу мышей MASP-2-/- (BALB/c) сравнивали с мышами дикого типа (BALB/c) при введении одной и той же дозы адриамицина. Мышей MASP-2-/-

подвергали обратному скрещиванию с мышами BALB/c в течение 10 поколений.

Животным дикого типа (n=8) и MASP-2-/- (n=8) в/в вводили адриамицин (10,5 мг/кг), а трем мышам каждой линии вводили только раствор хлорида натрия в качестве контроля. Всех мышей умерщвляли через две недели после лечения и собирали ткани. Степень патогистологического повреждения оценивали при окрашивании ГЭ.

Результаты:

На **ФИГУРЕ 37** показаны репрезентативные окрашенные ГЭ срезы тканей следующих групп мышей в день 14 после лечения адриамицином или только раствором хлорида натрия (контроль): (панели A-1, A-2, A-3) контрольные мыши дикого типа, получавшие только раствор хлорида натрия; (панели B-1, B-2, B-3) мыши дикого типа, получавшие адриамицин; и (панели C-1, C-2, C-3) мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин. Каждый снимок (например, панель A-1, A-2, A-3) представляет разных мышей.

Как показано на ФИГУРЕ 37, в группе MASP-2-/-, получавшей адриамицином, наблюдали гораздо более высокую степень сохранности ткани по сравнению с группой дикого типа, получавшей такую же дозу адриамицина.

На **ФИГУРЕ 38** графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных антителом, специфичным к F4/80 макрофагов, показывающие среднюю площадь окрашивания макрофагов (%) для следующих групп мышей в день 14 после лечения адриамицином или только раствором хлорида натрия (контроль дикого типа): контрольные мыши дикого типа, которым вводили только раствор хлорида натрия; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; мыши MASP-2-/-, получавшие только физиологический раствор, и мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин. Как показано на ФИГУРЕ 38, у мышей MASP-2-/-, получавших адриамицин, наблюдали уменьшенную инфильтрацию макрофагов (**p=0,007) по сравнению с мышами дикого типа, получавшими адриамицин.

На ФИГУРЕ 39 графически проиллюстрированы результаты компьютерного анализа изображений срезов ткани почек, окрашенных сириусом красным, показывающие окрашенную площадь отложений коллагена (%), у следующих групп мышей в день 14 после лечения адриамицином или только раствором хлорида натрия (контроль дикого типа): контрольные мыши дикого типа, получавшие только раствор хлорида натрия; мыши дикого типа, получавшие адриамицин; мыши MASP-2-/-, получавшие только раствор хлорида натрия, и мыши MASP-2-/-, получавшие адриамицин. Как показано на ФИГУРЕ 39, у мышей MASP-2-/-, получавших адриамицин, наблюдали уменьшенное отложение коллагена (**p=0,005) по сравнению с мышами дикого типа, получавшими адриамицином.

Общая оценка результатов и выводы:

Уменьшение тубулоинтерстициального воспаления почек является ключевой целью лечения заболевания почек. Результаты, представленные в данном примере, показывают, что лектиновый путь активации комплемента вносит значительный вклад в

развитие почечного тубулоинтерстициального воспаления. Как дополнительно продемонстрировано в настоящем документе, MASP-2-ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело, можно применять в качестве нового терапевтического подхода при лечении протеинурической нефропатии, адриамициновой нефропатии и уменьшении тяжести тубулоинтерстициального воспаления почек.

ПРИМЕР 19

В данном примере описаны первоначальные результаты продолжающегося клинического исследования фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального MASP-2-ингибирующего антитела у взрослых со стероид-зависимой иммуноглобулин А-нефропатией (IgAN) и у взрослых со стероид-зависимой мембранозной нефропатией (MH).

Теоретические основы:

Хронические заболевания почек поражают более 20 миллионов человек в США (Drawz P. et al., Ann Intern Med 162(11); ITC1-16, 2015). Гломерулонефропатии (ГН), включая IgAN и MH, представляют собой заболевания почек, при которых повреждаются клубочки, и которые часто приводят к терминальной стадии почечной недостаточности и потребности в диализе. Существует несколько типов первичных ГН, наиболее распространенной из которых является IgAN. Многие из таких больных имеют стойкое воспаление почек и прогрессирующее ухудшение состояния. Часто таких больных лечат кортикостероидами или иммунодепрессантами, которые имеют много серьезных долгосрочных побочных эффектов. Состояние многих больных продолжает ухудшаться даже после применения такой терапии. Не одобрено никаких средств для лечения IgAN или MN.

IgA-*нефропатия*

Иммуноглобулин А нефропатия (IgAN) - аутоиммунное заболевание почек, приводящее к интраренальному воспалению и повреждению почек. IgAN является наиболее распространенным первичным гломерулярным заболеванием во всем мире. При ежегодной заболеваемости примерно 2,5 случаев на 100000 человек, по имеющимся оценкам, у 1 из 1400 человек в США разовьется IgAN. У 40% пациентов с IgAN развивается терминальная стадия почечной недостаточности (ТХПН). Пациенты обычно демонстрируют микроскопическую гематурию с протеинурией, от легкой до умеренной, и различные уровни почечной недостаточности (Wyatt R.J., et al., N Engl J Med 368(25):2402-14, 2013). Клинические маркеры, такие как нарушение функции почек, стойкая гипертензия и тяжелая протеинурия (более 1 г в день), ассоциированы с неблагоприятным прогнозом (Goto M et al., Nephrol Dial Transplant 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. et al., J Am Soc Nephrol 22(4):752-61, 2011). Протеинурия является сильнейшим прогностическим фактором, независимым от других факторов риска, в многочисленных крупных обсервационных и проспективных исследованиях (Coppo R. et al., J Nephrol 18(5):503-12, 2005; Reich H. N., et al., J Am Soc Nephrol 18(12):3177-83, 2007). По некоторым подсчетам у 15-20% пациентов развивается терминальная почечная недостаточность в течение 10 лет

после возникновения заболевания, если не начато своевременное лечение (D'Amico G., Am J Kidney Dis 36(2):227-37, 2000).

Характерным диагностическим признаком IgAN является преобладание отложений IgA, отдельно или вместе с IgG и/или IgM, в мезангии клубочков. При IgAN при биопсии почек обнаруживают гломерулярное отложение маннан-связывающего лектина (МСЛ), ключевой распознаваемой молекулы для активации MASP-2, эффекторного фермента лектинового пути системы комплемента. Гломерулярные отложения маннан-связывающего лектина, обычно колокализированные с IgA и указывающие на активацию комплемента, и высокие уровни маннан-связывающего лектина в моче ассоциированы с неблагоприятным прогнозом при IgAN, причем у таких пациентов наблюдаются более серьезные гистологические изменения и мезангиальная пролиферация, чем у пациентов без отложения МСЛ или высоких уровней МСЛ в моче (Matsuda M. et al., Nephron 80(4):408-13, 1998; Liu LL et al., Clin Exp Immunol 169(2):148-155, 2012; Roos A. et al., J Am Soc Nephrol 17(6):1724-34, 2006; Liu LL et al., Clin Exp Immunol 174(1):152-60, 2013). Процент случаев ремиссии у пациентов с отложением МСЛ также значительно ниже (Liu LL et al., Clin Exp Immunol 174(1):152-60, 2013).

Текущая терапия при IgAN включает контроль артериального давления и, часто, применение кортикостероидов и/или других иммунодепрессантов, таких как циклофосфамид, азатиоприн или микофенолат мофетил, при тяжелом течении заболевания (например, серповидной IgAN). В Клиническом руководстве по улучшению глобальных результатов лечения болезней почек (KDIGO) при гломерулонефрите (Int. Soc of Nephrol 2(2):139-274, 2012) рекомендуется назначать кортикостероиды пациентам с протеинурией в дозе выше или равной 1 г/сутки, при обычной продолжительности лечения 6 мес. Однако даже при агрессивной иммунодепрессивной терапии, связанной с серьезными долгосрочными осложнениями, у некоторых пациентов наблюдается прогрессирующее ухудшение функции почек. Одобренного лечения IgAN не существует, и даже при использовании ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) или блокаторов рецепторов ангиотензина (ARB) для контроля артериального давления у некоторых пациентов сохраняется повышенная протеинурия. Ни один из указанных методов лечения не останавливает или даже не замедляет прогрессирование IgAN у пациентов с риском быстрого прогрессирования заболевания.

Мембранозная нефропатия

Ежегодная заболеваемость мембранозной нефропатией (МН) составляет приблизительно 10-12 случаев на 1000000. Пациенты с МН могут иметь различное клиническое течение, но примерно у 25% развивается терминальная стадия почечной недостаточности.

Мембранозная нефропатия является иммуноопосредованным гломерулярным заболеванием и одной из наиболее частых причин нефротического синдрома у взрослых. Заболевание характеризуется образованием иммунных отложений, преимущественно IgG4, на внешней стороне базальной мембраны клубочков, которая содержит антигены

подоцитов и антитела, специфичные к этим антигенам, что приводит к активации комплемента. Начальные проявления МН связаны с нефротическим синдромом: протеинурия, гипоальбуминемия, гиперлипидемия и отек.

Хотя МН может спонтанно пройти без лечения, у одной трети пациентов наблюдается прогрессирующее снижение функции почек и переход в терминальную стадию почечной недостаточности, в медиане через 5 лет после постановки диагноза. Часто для лечения МН применяются кортикостероиды, и существует потребность в разработке альтернативных методов терапии. Кроме того, пациенты с умеренным риском прогрессирования при оценке по тяжести протеинурии проходят лечение преднизоном в сочетании с циклофосфамидом или ингибитором кальциневрина, причем эти два вида лечения вместе часто связаны с тяжелыми системными побочными эффектами.

Методы:

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

В данном примере описаны промежуточные результаты продолжающегося, неконтролируемого многоцентрового исследования фазы 2 применения MASP-2-ингибирующего антитела, OMS646, у субъектов с IgAN и МН. Критерии включения требуют, чтобы все пациенты, участвующие в этом исследовании, независимо от подтипа почечной недостаточности, получали стабильную дозу кортикостероидов в течение не меньше 12 недель до включения в исследование (т.е. пациенты являются стероидозависимыми). Исследование представляет собой одногрупповое предварительное исследование с 12-недельным курсом лечения и 6-недельным периодом последующего наблюдения.

Планируется, что для каждого заболевания будет включено примерно четыре субъекта. Исследование предназначено для оценки, может ли OMS646 улучшать функцию почек (например, уменьшать протеинурию) и снижать потребность в кортикостероидах у субъектов с IgAN и МН. На сегодняшний день 2 пациента с IgA-нефропатией и 2 пациента с мембранозной нефропатией завершили лечение в исследовании.

При включении в исследование каждый субъект должен иметь высокие уровни белка в моче, несмотря на продолжающееся лечение с применением стабильной дозы кортикостероидов. Эти критерии выбирают для пациентов, у которых маловероятно спонтанное улучшение в течение периода исследования.

Возраст субъектов на момент скрининга составлял ≥18 лет, и их включали в исследование только в том случае, если у них был установлен один из следующих диагнозов: IgAN, диагностированная при биопсии почки, или первичная МН, диагностированная при биопсии почки. Включенные в исследование пациенты также должны были соответствовать всем следующим критериям включения:

(1) иметь среднее соотношение альбумина/креатинина в моче >0,6 в трех образцах, собранных последовательно и ежедневно перед каждым из 2 посещений в течение

периода скрининга;

(2) принимать ≥10 мг преднизолона или эквивалентную дозу в течение по меньшей мере 12 недель до скринингового посещения 1;

(3) в случае применения иммуносупрессивной терапии (например, циклофосфамида, микофенолата мофетила), получать стабильную дозу в течение по меньшей мере 2 месяцев до скринингового посещения 1 без ожидаемого изменения дозы на протяжении всего исследования;

(4) иметь расчетную скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) ≥30 мл/мин/1,73 $м^2$, вычисленную по уравнению MDRD[1];

(5) получать назначенное врачом стабильное оптимизированное лечение ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ) и/или блокаторами рецепторов ангиотензина (ARB) и иметь систолическое артериальное давление <150 мм рт.ст. и диастолическое артериальное давление <90 мм рт.ст. в покое;

(6) не должны применять белимумаб, экулизумаб или ритуксимаб в течение 6 месяцев после первого скринингового посещения; и

(7) не должны иметь в анамнезе пересадку почки.

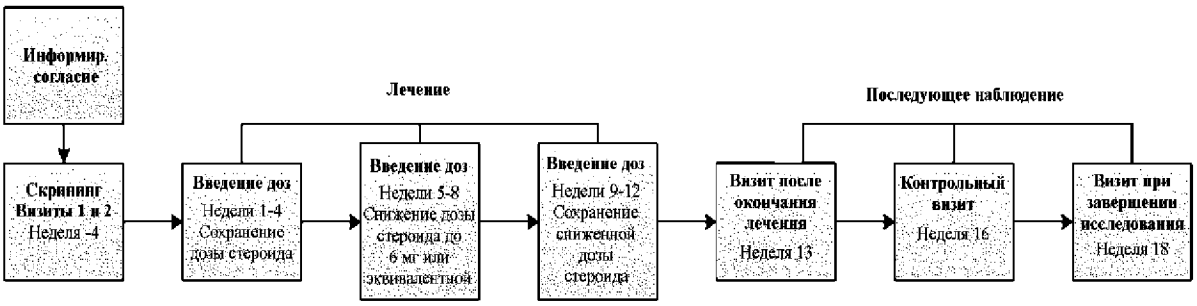
Уравнение [1]MDRD: рСКФ (мл/мин/1,73 $м^2$)=175×(СКр)$^{-1,154}$× (возраст)$^{-0,203}$×(0,742 для женщин)×(1,212 для афроамериканцев). Примечание: СКр=креатинин сыворотки должен быть указан в единицах мг/дл.

Моноклональное антитело OMS646, используемое в данном исследовании, представляет собой полностью человеческое моноклональное IgG4 антитело, которое связывает и ингибирует MASP-2 человека. MASP-2 - эффекторный фермент лектинового пути. Как показано в Примере 12, OMS646 активно связывается с рекомбинантным MASP-2 (кажущаяся равновесная константа диссоциации в диапазоне 100 пМ) и демонстрирует больше чем 5000-кратную селективность по сравнению с гомологичными белками C1s, C1r и MASP-1. В функциональных анализах OMS646 ингибирует лектиновый путь человека с наномолярной активностью (с концентрацией, приводящей к 50% ингибированию [IC50], приблизительно 3 нМ), но не оказывает существенного влияния на классический путь. OMS646, вводимое путем внутривенной (в/в) или подкожной (п/к) инъекции мышам, не относящимся к человеку приматам и человеку, приводило к высоким концентрациям в плазме, которые были связаны с подавлением активации лектинового пути в анализе ex vivo.

В данном исследовании лекарственная субстанция OMS646 была предоставлена в концентрации 100 мг/мл и дополнительно разбавлена для в/в введения. Соответствующий рассчитанный объем раствора для инъекций OMS646 100 мг/мл отбирали из флакона с помощью шприца для приготовления дозы. Инфузионный пакет вводили в течение четырех часов после приготовления.

Исследование состоит из периодов скрининга (28 дней), лечения (12 недель) и последующего наблюдения (6 недель), как показано на схеме плана исследования ниже.

Схематический план исследования



В течение периода скрининга и перед первой дозой OMS646 субъекты, давшие согласие, предоставили три образца мочи (собранные в разные дни) в каждый из двух периодов из трех последовательных дней для установления исходных значений отношения альбумина к креатинину в моче. После периода скрининга подходящие субъекты получали OMS646 в дозе 4 мг/кг в/в один раз в неделю в течение 12 недель (период лечения). После введения последней дозы OMS646 следовал 6-недельный период наблюдения.

В течение первых 4 недель лечения OMS646 субъекты получали стабильную дозу кортикостероидов до начала исследования. В конце первых 4 недель 12-недельного периода лечения субъектам вводили сниженную дозу кортикостероидов (т.е. дозу кортикостероидов снижали), если они переносили такое снижение, на 4 недели, после которых в течение следующих 4 недель такую дозу кортикостероидов сохраняли. Целью было снижение до ≤6 мг преднизона (или эквивалентной дозы) в сутки. В течение этого периода постепенное снижение дозы прекращали у пациентов с ухудшением почечной функции, как определял исследователь. Субъектам вводили OMS646 при постепенном снижении дозы кортикостероидов и в течение полных 12 недель лечения. Затем пациентов наблюдали в течение еще 6 недель после их последнего лечения. Снижение дозы кортикостероидов и лечение OMS646 позволило оценить, позволяет ли OMS646 снизить дозу кортикостероидов, требуемую для поддержания стабильной функции почек.

Ключевыми показателями эффективности в этом исследовании являются изменение отношения альбумина к креатинину в моче (АКС) и суточные уровни белка от исходного состояния до 12 недель. Измерение белка или альбумина в моче обычно используется для оценки поражения почек, и стойкий высокий уровень белка в моче коррелирует с прогрессированием почечной недостаточности. АКС используют клинически для оценки протеинурии.

Анализ эффективности

Значение в анализе АКС определяется как среднее всех значений, полученных для определенной точки времени. Планируемое количество значений АКС составляет три в каждой запланированной точке времени. Исходное значение АКС определяется как среднее значение результатов анализа при двух скрининговых посещениях.

Результаты:

На **ФИГУРЕ 40** графически проиллюстрировано АКС у двух пациентов с IgAN в ходе двенадцатинедельного исследования с еженедельным лечением 4 мг/кг MASP-2-

ингибирующего антитела (OMS646). Как показано на ФИГУРЕ 40, изменение по сравнению с исходным значением является статистически значимым в точке времени "a" (p=0,003); точке времени "b" (p=0,007) и точке времени "c" (p=0,033) в нетрансформированном анализе. В ТАБЛИЦЕ 12 представлены данные значений белка в суточной моче у двух пациентов с IgAN, получавших OMS646.

ТАБЛИЦА 12: Белок в суточной моче (мг/день) у получавших OMS646 больных IgAN

Время получения образца	Пациент #1 (мг/24 часа)	Пациент #2 (мг/24 часа)	Среднее
Исходное состояние	3876	2437	3156
День 85	1783	455	1119
p=0,017			

Как показано на ФИГУРЕ 40 и в ТАБЛИЦЕ 12, пациенты с IgAN демонстрировали клинически и статистически значимое улучшение функции почек в ходе исследования. Наблюдали статистически значимое снижение как АКС (см. ФИГУРУ 40), так и концентрации белка в суточной моче (см. ТАБЛИЦУ 12). Как показано в данных АКС на ФИГУРЕ 40, средний исходный уровень АКС составлял 1264 мг/г и достигал 525 мг/г в конце лечения (p=0,011), снижаясь до 128 мг/г в конце периода последующего наблюдения. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 40, лечебный эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. При измерении выделения белка в суточной моче отслеживали АКС со средним снижением с 3156 мг/24 часа до 1119 мг/24 часа (p=0,017). Эффекты лечения у двух пациентов были очень однородными. У обоих пациентов наблюдали снижение примерно на 2000 мг/день, при этом оба пациента достигали частичной ремиссии (определяемой как больше чем 50-процентное снижение выделения белка в суточной моче и/или итоговое выделение белка меньше 1000 мг/день; полная ремиссия определяется как выделение белка меньше 300 мг/день). Величина снижения суточной протеинурии у обоих пациентов с IgA-нефропатией связана со значимым улучшением выживаемости при заболевании почек. Оба пациента с IgA-нефропатией также смогли существенно снизить применяемую дозу стероидов с уменьшением суточной дозы до ≤5 мг (с 60 мг до 0 мг; с 30 мг до 5 мг).

Два пациента с МН также продемонстрировали снижение АКС во время лечения OMS646. У одного пациента с МН было отмечено снижение АКС с 1003 мг/г до 69 мг/г, причем такой низкий уровень сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. У другого пациента с МН было отмечено снижение АКС с 1323 мг/г до 673 мг/г с переменным течением после лечения. У первого пациента с МН наблюдали заметное снижение уровня белка в суточной моче (10771 мг/24 часа в исходном состоянии до 325 мг/24 часа в день 85), с достижением частичной или почти полной ремиссии, тогда как у другого пациента уровень белка в моче практически не изменился (4272 мг/24 часа в исходном состоянии до 4502 мг/24 в день 85). Стероиды были снижены у двух пациентов

с МН с 30 мг до 15 мг и с 10 мг до 5 мг.

Таким образом, у пациентов с IgAN и МН, получавших MASP-2-ингибирующее антитело OMS646, наблюдали стойкие улучшения функции почек. Эффекты лечения OMS646 у пациентов с IgAN являлись устойчивыми и однородными, что указывает на явные признаки эффективности. Эти эффекты подтверждались результатами пациентов с МН. Динамика и величина изменений АКС во время лечения были однородными у всех четырех пациентов с IgAN и МН. Существенные опасения по поводу безопасности отсутствовали. Пациенты в этом исследовании представляли плохо поддающуюся лечению группу, при этом считается, что терапевтический эффект у таких пациентов позволяет прогнозировать эффективность MASP-2-ингибирующего антитела, такого как OMS646, у пациентов с IgAN и МН, таких как пациенты, страдающие стероидозависимой IgAN и МН (т.е. пациенты, получающие лечение с применением стабильной дозы кортикостероидов до лечения MASP-2-ингибирующим антителом), включая пациентов с риском быстрого прогрессирования до терминальной стадии почечной недостаточности.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта-человека, страдающего IgAN или МН, включающий введение субъекту композиции, включающей количество MASP-2-ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту-человеку, страдающему IgAN или МН, количества MASP-2-ингибирующего антитела, достаточного для улучшения функции почек (например, уменьшения протеинурии). В одном варианте осуществления субъект страдает стероидозависимой IgAN. В одном варианте осуществления субъект страдает стероидозависимой МН. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело вводят субъекту, страдающему стероидозависимой IgAN или стероидозависимой МН, в количестве, достаточном для улучшения функции почек и/или снижения дозы кортикостероидов у указанного субъекта.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего стероидозависимой IgAN, до этапа введения субъекту композиции, включающей количество MASP-2-ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего стероидозависимой МН, до этапа введения субъекту композиции, включающей количество MASP-2-ингибирующего антитела, эффективное для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, MASP-2-ингибирующее антитело демонстрирует по меньшей мере одну или больше из следующих характеристик: указанное антитело связывает MASP-2 человека с K_D 10 нМ или меньше, указанное антитело связывает эпитоп в CCP1 домене MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в анализе in vitro в 1% человеческой сыворотке при IC_{50} 10 нМ или меньше, указанное антитело ингибирует отложение C3b в

90% человеческой сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, где антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, где указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, где молекула IgG4 включает мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывается с MASP-2 и селективно ингибирует лектиновый путь и по существу не ингибирует классический путь (т.е. ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или нескольких клинических параметров, связанных с функцией почек, таких как уменьшение протеинурии (например, снижение АКС и/или снижение концентрации белка в суточной моче, например, снижение выделения белка в суточной моче больше чем на 20 процентов, или снижение выделения белка в суточной моче больше чем на 30 процентов или, например, снижение выделения белка в суточной моче больше чем на 40 процентов или, например, снижение выделения белка в суточной моче больше чем на 50 процентов).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2-ингибирующего антитела субъекту, страдающему IgAN (например, стероидозависимой IgAN), через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель, или трех недель, или четырех недель, или больше) с последующим подкожным введением субъекту MASP-2-ингибирующего антитела в течение второго периода времени (например, последующего периода продолжительностью по меньшей мере две недели или больше).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2-ингибирующего средства субъекту, страдающему МН (например, стероидозависимой МН), через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере от одного дня до недели или двух недель, или трех недель, или четырех недель, или больше) с последующим подкожным введением субъекту MASP-2-ингибирующего антитела в течение второго периода времени (например, последующего периода продолжительностью по меньшей мере две недели или больше).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2-ингибирующего антитела субъекту, страдающему IgAN (например, стероидозависимой IgAN) или МН (например, стероидозависимой МН), внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть длительным и проводиться от ежедневного до ежемесячного, но предпочтительно, по меньшей мере, раз в две недели или, по меньшей мере, один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего IgAN (например, стероидозависимой IgAN) или МН (например, стероидозависимой МН), включающее введение субъекту композиции, включающей некоторое количество MASP-

2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR- L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления композиция включает MASP-2-ингибирующее антитело, включающее: (a) вариабельную область тяжелой цепи, включающую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 31-35 SEQ ID NO:67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 50-65 SEQ ID NO:67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 95-107 SEQ ID NO:67, и b) вариабельную область легкой цепи, включающую: i) CDR-L1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность с 24 по 34 SEQ ID NO:69; и ii) CDR-L2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность 50-56 SEQ ID NO:69; и iii) CDR-L3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 89-97 SEQ ID NO: 69, или (II) их вариант, включающий вариабельную область тяжелой цепи по меньшей мере с 90% идентичностью с SEQ ID NO:67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:67) и вариабельную область легкой цепи с идентичностью по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:69).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей некоторое количество MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, включающей MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично распознают, по меньшей мере, часть эпитопа на MASP-2 человека, распознаваемого референсным антителом OMS646, включающим вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему или подвергающемуся риску развития IgAN (например, стероидозависимой IgAN) или MH (например, стероидозависимой MN), композиции, включающей MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность,

представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69, в дозе от 1 мг /кг до 10 мг/кг (т.е. 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг), по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение периода продолжительностью по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель, или по меньшей мере 9 недель, или по меньшей мере 10 недель, или по меньшей мере 11 недель, или по меньшей мере 12 недель.

ПРИМЕР 20

В данном Примере описано исследование с применением MASP-2-ингибирующего антитела, OMS646, при лечении субъекта, страдающего или подвергающегося риску развития коронавирусного острого респираторного дистресс-синдрома.

Теоретические основы/обоснование:

Острый респираторный дистресс-синдром - тяжелое осложнение коронавирусной инфекции. SARS-CoV появился в 2002 и 2003 годах из коронавируса, циркулирующего на рынках животных в Китае, что привело к глобальной вспышке респираторного заболевания с больше чем 8000 случаев заболевания человека и 10% смертностью (Rota P.A. et al., Science 300:1394-1999, 2003). В 2012 году на Ближнем Востоке был обнаружен новый родственный коронавирус, обозначенный как коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), вызывающий тяжелое респираторное заболевание со смертностью более 35% (Zaki A.M. et al., N Engl J Med 367:1814-1820, 2012). Коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19) - инфекционное заболевание, которое появилось в 2019 году и вызвано коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-коронавирусом 2 или SARS-CoV-2), вирусом, близко родственным вирусу атипичной пневмонии (World Health Organization, 2/11/2020, Novel Coronavirus Situation Report 22). COVID-19, SARS-CoV и MERS-CoV вызывают целый ряд заболеваний: от бессимптомных случаев до тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (коронавирусного ОРДС) и дыхательной недостаточности. У лиц, страдающих COVID-19, может развиваться повышенная температура, сухой кашель, усталость и одышка. Результаты компьютерной томографии могут показать затемнения в легких по типу матового стекла и двустороннее очаговое затемнение. Случаи могут прогрессировать до дыхательной дисфункции, включая пневмонию, тяжелый острый респираторный дистресс-синдром, который может привести к полиорганной недостаточности и септическому шоку, а также к смерти наиболее уязвимых лиц (см., например, Hui D.S. et al., Int J Infect Dis 91:264-266, Jan 14, 2020 и Guan et al. OI:10.1056/NEJMoa2002032). Вакцины или специфического противовирусного лечения не существует, при этом контроль заболевания включает лечение симптомов и поддерживающую терапию. Таким образом, существует острая необходимость в разработке терапевтически эффективных средств для лечения, подавления и/или предотвращения коронавирусного острого

респираторного дистресс-синдрома.

Было отмечено, что активация комплемента способствует патогенезу коронавирусного тяжелого острого респираторного синдрома. Было обнаружено, что мыши, инфицированные SARS-CoV, с дефицитом компонента 3 комплемента (мыши C3-/-), демонстрируют значительно меньшую потерю веса и меньшую респираторную дисфункцию по сравнению с SARS-CoV-инфицированными контрольными мышами C57BL/6J, несмотря на эквивалентную вирусную нагрузку в легких (Gralinski L.E. et al., mBio 9:e01753-18, 2018). Кроме того, было отмечено, что в легких мышей C3-/-, инфицированных SARS-CoV, присутствовало значительно меньше нейтрофилов и воспалительных моноцитов, чем у контрольных инфицированных мышей, при этом также в легких мышей C3-/-, инфицированных SARS-CoV, наблюдали меньше патологии и более низкие уровни цитокинов и хемокинов (например, IL-5, IL-6) по сравнению с контрольными инфицированными мышами (Gralinski L.E. et al., mBio 9:e01753-18, 2018).

Исследования также показали, что у многих выживших после инфекции SARS-CoV развивается легочный фиброз с более высокой распространенностью у пожилых пациентов (Hui D.S. et al., Chest 128:2247-2261, 2005). Существуют ограниченные возможности лечения фиброза легких, например коронавирусного фиброза. Традиционно кортикостероиды применяются для лечения ОРДС и фиброза легких, однако во время вирусной инфекции такое лечение ослабляет иммунный ответ и может привести к ухудшению течения заболевания (Gross T.J. et al., N Engl J Med 345:517-525, 2001).

Как отмечено ранее, эффективное лечение COVID-19 не известно, и болезнь быстро распространяется. Хотя оценки смертности еще предварительны, Всемирная организация здравоохранения сообщала, что уровень смертности в начале марта 2020 года составлял 3,4% (worldwideweb.who.int/dg/speeches/ detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---3-march-2020). Для пациентов с тяжелой инфекцией COVID-19 необходимо эффективное лечение.

Как описано в настоящем документе, лектиновый путь является одним из трех путей активации комплемента. Другими путями являются классический путь и альтернативный путь. Все пути активации приводят к образованию анафилатоксинов C3a и C5a и к формированию C5b-9 или мембраноатакующего комплекса (МАК) на клетках-мишенях.

Лектиновый путь является частью врожденной иммунной системы и активируется микроорганизмами или поврежденными клетками. Микроорганизмы экспонируют углеводные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), а поврежденные клетки-хозяева экспонируют молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP). DAMP не экспонируются на здоровых клетках, однако становятся доступными при повреждении клеток.

Циркулирующие лектины, такие как маннозосвязывающий лектин (МСЛ), фиколины и коллектины, распознают и связываются с PAMP и DAMP. Связывание лектина с PAMP или DAMP локализует активацию комплемента вблизи от клеточной

мембраны. Эти лектины несут маннан-связывающий лектин-ассоциированную сериновую протеазу 2 (MASP-2), которая расщепляет факторы комплемента 2 и 4 с образованием C3-конвертазы, которая затем сама расщепляет C3 с образованием C5-конвертазы. В дополнение к активации лектинового пути, альтернативный путь также может активироваться и усилить активацию комплемента. Все это приводит к внедрению МАК в мембрану поврежденной клетки, что еще больше повреждает клетку, приводя к увеличению экспонирования DAMP. Циркулирующие лектины, несущие MASP-2, распознают и связываются с DAMP, вызывая дальнейшую активацию лектинового пути и дополнительное повреждение клеток. Таким образом, лектиновый путь может усиливать и усугублять повреждение клеток, вызванное первоначальной активацией комплемента.

Как описано в настоящем документе, OMS646 (также известное как OMS721 или нарсоплимаб) представляет собой экспериментальное моноклональное человеческое IgG4 антитело, направленное против MASP-2. Как дополнительно описано в настоящем документе, при блокировании MASP-2 активация лектинового пути подавляется. Это может прерывать описанный выше цикл комплемент-опосредованного клеточного повреждения. На сегодняшний день OMS646 было введено примерно 230 здоровым добровольцам, пациентам с тромботической микроангиопатией (TMA) и пациентам с гломерулонефропатиями (например, иммуноглобулин A [IgA] нефропатией)

Лектиновый путь может играть ключевую роль в инициировании и поддержании активации комплемента при ОРДС, вызванном коронавирусом, и ингибирование лектинового пути с применением MASP-2-ингибирующего средства, такого как MASP-2-ингибирующее антитело, OMS646, может быть направлено на комплемент-опосредованное повреждение легких, связанное с коронавирусной инфекцией. Как описано в настоящем документе, авторы изобретения обнаружили, что ингибирование маннан-связывающий лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 (MASP-2), ключевого регулятора лектинового пути системы комплемента, значительно снижает воспаление и фиброз в различных моделях фиброзного заболевания на животных. Например, результаты, представленные в Примерах 14 и 15, демонстрируют благоприятное влияние ингибирования MASP-2 на тубулоинтерстициальное воспаление почек, повреждение клеток канальцев, высвобождение профибротических цитокинов и рубцевание. Как описано в Примере 17, в анализе моноклонального MASP-2-ингибирующего антитела на эффективность при уменьшении и/или предотвращении воспаления и тубулоинтерстициального повреждения почек в модели протеинурии с белковой перегрузкой у мышей дикого типа было определено, что присутствовало значимое снижение уровня IL-6 в группе, получавшей MASP-2-ингибирующие антитела, в сравнении с контрольной группой, получавшей раствор хлорида натрия ($p=0,0269$), а также с группой изотипического контроля ($p=0,0445$), как показано на ФИГУРЕ 36.

Методы:

Следующее исследование проводят с целью исследования применения OMS646 при лечении одного или больше пациентов, страдающих коронавирусной инфекцией

(например, вирусом COVID-19), с целью измерения эффективности OMS646 при лечении, подавлении, облегчении или предотвращении острого респираторного дистресс-синдрома у указанного пациента(ов).

Методы включают идентификацию субъекта, инфицированного коронавирусом, таким как COVID-19, MERS-CoV или SARS, что можно определить путем проведения диагностического теста, такого как молекулярный тест (например, ОТ-ПЦРрв) или серологический тест, или при обращении к базе данных, содержащей такую информацию. Примеры тестов на COVID-19, MERS-CoV и SARS можно найти на сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний США (world-wide-web.cdc.gov/coronavirus/mers/lab/lab-testing.html#molecular).

Субъект может страдать ОРДС, вызванным COVID-19, или иметь риск развития ОРДС, например, субъект, страдающий пневмонией. Пневмония является наиболее распространенным фактором риска развития ОРДС (Sweeney R.M. and McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016).

ОРДС, вызванный COVID-19, определяется как клинический синдром, который развивается после инфицирования COVID-19 и соответствует одному или более следующим критериям ОРДС (Sweeney R.M. and McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016): на основе Берлинского определения (JAMA 307:2526, 2012):

- Оксигенация (мм рт.ст.): легкая (PaO_2/FiO_2 200-300); умеренная (PaO_2/FiO_2 100-199); тяжелая (PaO_2/FiO_2<100)
- Положительное давление в конце выдоха (ПДКВ) (см H_2O): требуется минимальное ПДКВ 5
- Инфильтраты на рентгенограмме грудной клетки: двусторонние инфильтраты с вовлечением двух или более квадрантов на фронтальной рентгенограмме грудной клетки или КТ.
- Сердечная недостаточность: левожелудочковая недостаточность недостаточна для объяснения клинического состояния
- Тяжесть: на основе критериев оксигенации

Введение лекарственного препарата

Субъектам, страдающим COVID-19 и испытывающим один или больше респираторных симптомов, таких как перечисленные выше критерии, вводят дозу 4 мг/кг OMS646 посредством внутривенной инфузии. Лекарственный препарат вводят два раза в неделю. Частота введения доз определяется по ответу пациента на терапию. Если у пациента наблюдается клиническое улучшение, которое сохраняется в течение 4 недель, доза может быть снижена до 4 мг/кг один раз в неделю. Если у пациента сохраняется ответ на лечение при получении 4 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель, лечение можно прекратить.

Положительный ответ на лечение определяют, если наблюдается улучшение дыхательной функции, например, при одном или больше респираторных симптомах, таких как один или более критериев ОРДС.

В соответствии с вышеизложенным, в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома или другого проявления заболевания у субъекта-млекопитающего, инфицированного коронавирусом, включающий введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента (т.е. ингибирования активации лектинового пути). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от одного или больше респираторных симптомов, и способ включает введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для уменьшения по меньшей мере одного респираторного симптома (т.е. улучшения дыхательной функции).

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному COVID-19. В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному SARS-CoV. В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному MERS-CoV. В одном варианте осуществления у субъекта выявлен коронавирус (т.е. COVID-19, SARS-CoV или MERS-CoV) до введения MASP-2-ингибирующего средства.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство представляет собой малую молекулу, которая ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором экспрессии MASP-2.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело по существу не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту,

инфицированному коронавирусом, композиции, включающей MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (т.е. 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг), по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раз в неделю) в течение по меньшей мере 2 недель (например, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель, или по меньшей мере 9 недель, или по меньшей мере 10 недель, или по меньшей мере 11 недель, или по меньшей мере 12 недель).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела составляет приблизительно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 мг/кг до 4,4 мг/кг).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу от приблизительно 300 мг до приблизительно 450 мг (т.е. от приблизительно 300 мг до приблизительно 400 мг или от приблизительно 350 мг до приблизительно 400 мг), такую как приблизительно 300 мг, приблизительно 305 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 315 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 335 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 345 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 355 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 365 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 385 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 395 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 405 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 415 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 435 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 445 мг или приблизительно 450 мг). В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу приблизительно 370 мг (±10%).

В одном варианте осуществления способ включает введение фиксированной дозы MASP-2-ингибирующего антитела приблизительно 370 мг (±10%) субъекту, инфицированному коронавирусом, внутривенно, два раза в неделю в течение периода лечения, составляющего по меньшей мере 8 недель.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство доставляется субъекту системно. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство вводят перорально, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутриартериально, внутривенно или в виде ингаляционного средства.

ПРИМЕР 21

Лечение OMS646 (нарсоплимабом) у больных COVID-19

В данном примере описано применение нарсоплимаба (OMS646) для лечения

пациентов, инфицированных COVID-19, с применением способов, описанных в Примере 20. Результаты, описанные в этом Примере, подтверждают эффективность нарсоплимаба у больных COVID-19, описанных в Примере 20.

Теоретические основы/обоснование:

Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2; COVID-19) был идентифицирован как клинический синдром в китайской провинции Хубэй в декабре 2019 года и быстро распространился (Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet, 395: 1054-62, 2020). К концу февраля 2020 года в северном итальянском регионе Ломбардия было диагностировано быстрорастущее число случаев заболевания COVID-19 (Remuzzi A, Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? The Lancet). Основной причиной смерти при COVID-19 является тяжелая дыхательная недостаточность. В ткани легких пациентов, умерших от COVID-19, присутствует высокая концентрация РНК SARS-CoV (Wichmann D. et al., Ann Intern Med, 2020) и такие же интенсивные воспалительные изменения, как и при ранее описанных коронавирусах SARS-CoV (SARS) и MERS-CoV (MERS), и противовоспалительные стратегии оценивают для лечения COVID-19 (Xu Z. et al., Lancet Respir Med, 8(4):420-2, 2020; Horby P. et al., medRxiv 2020: 2020.06.22.20137273; Gritti G. et al., medRxiv 2020: 2020.04.01.20048561). Также при SARS и инфекции COVID-19 сообщалось о тромбозах (Wichmann D. et al., Ann Intern Med 2020; Magro C. et al., Transl Res 2020; Ding Y. et al., J Pathol 200(3):28209, 2003). Как SARS и MERS, COVID-19 может вызывать угрожающий жизни острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) (Guan W.J, Ni Z.Y, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med 2020 [электронная публикация до выхода в печать]).

Центральным патологическим компонентом COVID-19 и экссудативной фазы ОРДС является повреждение и активация эндотелия (Varga Z. et al., Lancet 2020; Ackermann M. et al., N Engl J Med 2020; Green S. J. et al., Microbes Infect 22(4-5):149-50, 2020; Teuwen L.A. et al., Nat Rev Immunol 20(7):389-91, 2020; Goshua G. et al., Lancet Haematol 2020; Thompson B.T. et al., N Engl J Med 377(19):1904-5, 2017). Повреждение эндотелия, являющееся основной причиной повышенной проницаемости капилляров и отека легких при ОРДС, также может вызывать микроваскулярную ангиопатию и тромбоз. Повреждение эндотелия также может вызывать микроваскулярную ангиопатию и тромбоз. Активация эндотелия дополнительно усиливает локальное воспалительное окружение. Важно отметить, что, как показано в исследованиях с участием человека in vitro и на животных, повреждение эндотелия специфически активирует лектиновый путь комплемента на поверхности эндотелиальных клеток (Collard CD, Väkevä A, Morrissey MA, et al. Complement Activation after Oxidative Stress: Role of the Lectin Complement Pathway. Am J Pathol 2000; 156(5):1549-1556).

Как описано в Примере 20, ожидалось, что OMS646 (также известный как нарсоплимаб), высокоаффинное моноклональное антитело, которое связывается с MASP-2

и блокирует активацию лектинового пути, будет эффективным для лечения больных COVID-19. В соответствии с описанием в Примере 20, MASP-2 был непосредственно связан с повреждением легких при коронавирусной инфекции в модели на животных. См. Gao et al., medRxiv, 3/30/2020. MASP-2 также действует непосредственно на коагуляционный каскад и систему контактов, расщепляя протромбин до тромбина и образуя фибриновые сгустки. Нарсоплимаб не только ингибирует активацию лектинового пути, но также блокирует микрососудистое повреждение, связанное с образованием тромбов, а также MASP-2-опосредованную активацию калликреина и фактора XII.

Эффективность лечения COVID-19 с применением специфических средств не была доказана. Ввиду тяжелого бремени болезни в Италии пациентов с тяжелой инфекцией COVID-19 и ОРДС лечили нарсоплимабом в рамках программы применения из соображений гуманности в больнице имени Папы Джованни XXIII в Бергамо. Это первый случай, когда ингибитор лектинового пути применили для лечения больных COVID-19. Здесь представлен опыт такого первоначального клинического применения.

Методы

Надзор за исследованием

Исследование, описанное в данном Примере, было проведено в Территориальном отделении социального обеспечения и здравоохранения больницы имени Папы Джованни XXIII в Бергамо, Италии, и одобрено институциональным комитетом по этике и Итальянским агентством по лекарственным средствам. Лабораторные показатели, включая анализы крови, ЛДГ, С-реактивный белок (СРБ), собирали в соответствии со стандартной клинической практикой. Все пациенты, получавшие нарсоплимаб (OMS646), предоставили информированное согласие. Это исследование проводили с использованием способов, описанных в Примере 20, как дополнительно описано ниже.

Патогистологическое исследование

Стандартное окрашивание гематоксилином и эозином (ГЭ) и иммуногистохимию проводили на фиксированных формалином и залитых парафином образцах, полученных при патологоанатомическом вскрытии больных COVID-19. Окрашенные ГЭ срезы исследовали два патологоанатома. Для подтверждения диагноза проводили иммуногистохимический анализ на маркер эндотелиальных клеток человека (CD34) при использовании антитела Bond Ready-to-Use Antibody CD34 (клон QBEnd/10, Leica Biosystems, Germany), готового к применению продукта, специально оптимизированного для использования с Bond Polymer Refine Detection. Анализ проводили на автоматизированной платформе для окрашивания (Leica Bond-3, Leica, Germany) с использованием методики термического демаскирования антигена, как рекомендовано производителем (раствор Bond Epitope Retrieval solution 2 в течение 20 минут). Цитоплазматическое окрашивание эндотелия в капиллярах легочных альвеол указывало на положительные результаты.

Идентификация и подсчет циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК)

ЦЭК исследовали с помощью проточного цитометрического анализа, который

проводили на собранных образцах периферической крови с ЭДТА. После этапа лизиса эритроцитов образцы метили следующими моноклональными антителами: против CD45 V500 (клон 2D1, Becton Dickinson, San Jose, CA), против CD34 PerCP-CY5.5 (клон 8G12, Becton Dickinson, San Jose, CA), против CD146 PE (клон P1H12BD, Pharmingen, CA), в течение 20 мин при комнатной температуре. По меньшей мере 1×10^6 событий/образец с общей морфологией лейкоцитов регистрировали с помощью проточной цитометрии (FACSLyric, BD Biosciences). Для уменьшения вариабельности из-за действий оператора, все образцы в этом исследовании всегда исследовал один и тот же лаборант. Количество ЦЭК/мл рассчитывали методом двухплатформенного подсчета с использованием субпопуляции лимфоцитов в качестве референсной популяции, как сообщалось ранее (Almici C. et al., Bone Marrow Transplant 52:1637-42, 2017).

Уровни цитокинов в сыворотке

Уровни интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-1β (IL-1β), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-10 (IL-10), фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-12p70 (IL-12p70) исследовали в одном образце сыворотки с помощью проточной цитометрии (набор BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Пациенты

Все пациенты, получавшие нарсоплимаб, были госпитализированы в период с 11 по 23 марта 2020 года. За этот 13-дневный период общее количество пациентов с COVID-19, ежедневно госпитализируемых в палаты, варьировало от 405 до 542. За тот же период ежедневно использовалось в среднем 140 устройств постоянного положительного давления в дыхательных путях (CPAP) с маской, и в среднем 82 пациента (диапазон 66-91) ежедневно проходили лечение в ОРИТ. Из пациентов в ОРИТ, 61 соответствовал Берлинским критериям ОРДС (соотношение PaO2/FiO2 <100 - тяжелый ОРДС; 100-200 - умеренный; >200 и ≤300 - легкий) (Ferguson N.D et al., Intensive Care Med 38(10): 1573-82, 2012; Fagiuoli S. et al., N Engl J Med 382(21)e71, 2020) на 11 марта 2020 года и 80 на 23 марта 2020 года.

Все пациенты, получавшие лечение в этом исследовании, имели лабораторно подтвержденную инфекцию COVID-19, диагностированную с помощью анализа количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой. Геном SARS-CoV-2 из образцов мазков из носа и дыхательных путей был обнаружен с помощью различных молекулярных методов, включая набор GeneFinder™ Covid-19 Plus RealAmp Kit (ELIThech Group, 92800 Puteaux, France) и тест Allplex™ 2019-nCoV (Seegene Inc, Arrow Diagnostics S.r.l., Italy). После очистки вирусной РНК из клинических образцов проводили обнаружение вирусных генов RdRp, E и N с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени в соответствии с протоколом Всемирной организации здравоохранения (Corman V.M. et al., Euro Surveill 25, 2020). Для получения возможности лечения нарсоплимабом, пациенты с подтвержденным COVID-19 должны были быть взрослыми (старше 18 лет) и иметь ОРДС в соответствии с Берлинскими критериями (Ferguson ND, et al. Intensive Care 38(10):1573-1582, 2012; также см. Sweeney R.M. and

McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016; JAMA 307:2526, 2012) и требовать неинвазивной искусственной вентиляции с постоянным положительным давлением в дыхательных путях (CPAP) в соответствии с руководствами учреждения по респираторной поддержке. Хотя все включенные в исследование пациенты получали экспериментальное лечение азитромицином в дозе 500 мг один раз в сутки, пациенты с активными системными бактериальными или грибковыми инфекциями, требующими противомикробной терапии, не подходили для лечения нарсоплимабом.

Лечение нарсоплимабом, поддерживающая терапия и оценка результатов

Как описано в Примере 20, нарсоплимаб (OMS646) - полностью человеческое моноклональное антитело, состоящее из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 4 (IgG4) и легкой цепи лямбда. Он связывает и ингибирует MASP-2 с субнаномолярной аффинностью. В соответствии со способами, описанными в Примере 20, нарсоплимаб вводили шести пациентам, инфицированным COVID-19, в дозе 4 мг/кг внутривенно, два раза в неделю в течение 2-4 недель, с максимальным количеством доз от 6 до 8 (в течение двух недель, трех недель или четырех недель). В начале исследования продолжительность введения доз была установлена в течение 2 недель, но была экспериментально увеличена, когда у первого пациента, получавшего нарсоплимаб, развился клинический и подтвержденный результатами лабораторных исследований рецидив после прекращения лечения через 2 недели, который впоследствии разрешился после дополнительной недели введения доз. Все пациенты получали стандартную поддерживающую терапию в соответствии с рекомендациями больницы на момент исследования, включая профилактическое применение эноксапарина (Клексан, Sanofi Aventis) 4000 МЕ/0 4 мл, азитромицина (Зитромакс, Pfizer SpA, Italy) 500 мг один раз в день, гидроксихлорохина (Плаквенил, Sanofi Aventis) 200 мг 2 раза в сутки, дарунавира и кобицистата (Резолста, Janssen-Cilag S.p.A., Italy) 800/150 мг 1 раз в день. Начиная с 27 марта, в соответствии с обновленными рекомендациями, применяемыми в учреждении, все пациенты с COVID-19 в больнице получали метилпреднизолон в дозе 1 мг/кг. Соответственно, в общей сложности пять из шести пациентов, получавших нарсоплимаб, также получали системные кортикостероиды (метилпреднизолон 1 мг/кг) после начала лечения нарсоплимабом. Всю респираторную поддержку проводили в соответствии с правилами лечения в стационаре. Клинические характеристики этих шести пациентов приведены ниже в Таблице 13.

В дополнение к подсчету ЦЭК и уровням цитокинов у всех пациентов, получавших нарсоплимаб, в соответствии со стандартной клинической практикой собирали клинические и лабораторные показатели, включая общие анализы крови, уровни ЛДГ и С-реактивного белка (СРБ). Стандартные анализы крови собирали перед введением каждой дозы нарсоплимаба, а затем два раза в неделю. Дыхательную функцию оценивали ежедневно. Компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки делали всем пациентам при поступлении в стационар для документирования типичной интерстициальной пневмонии и легочной эмболии при наличии клинических показаний.

Рентгенографию грудной клетки проводили в соответствии с клиническими требованиями во время курса лечения.

Статистический анализ

Демографические и клинические данные пациентов представлены в виде частоты с процентным значением для категориальных переменных и медианой с диапазоном для постоянных. Различие по значениям ЦЭК между нормальными пациентами и больными COVID-19 оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Был проведен анализ с повторными измерениями для проверки различий по уровням ЦЭК и цитокинов во время лечения нарсоплимабом в соответствующие моменты времени; использовали непараметрический критерий Фридмана, а парные сравнения выполняли с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона для парных измерений. Тенденцию к снижению уровней ЛДГ и СРБ в ходе лечения оценивали с использованием непараметрического критерия Спирмена между наблюдениями и временем. Была зафиксирована значимость на уровне 5%. Анализ проводили при использовании программы R (версии 3 6 2).

В Таблице 13 представлены клинические характеристики шести пациентов, получавших нарсоплимаб.

ТАБЛИЦА 13: Демографические данные больных COVID-19, получавших нарсоплимаб

Клинические характеристики	**Все пациенты (N=6)**
Возраст - лет, медиана (диапазон)	56,5 лет (47-63)
Пол - количество (%)	
Женщины	1 (17%)
Мужчины	5 (83%)
Вес - килограммы, медиана (диапазон)	86 (82-100)
ИМТ - килограммы/м^2, медиана (диапазон)	28 (26,8-32)
Время от начала болезни до госпитализации - дни, медиана(диапазон)	8,5 (3-12)
Температура[##] при поступлении в больницу - количество (%)	6 (100%)
Другие симптомы - количество (%)	
Кашель	1 (17%)
Анорексия	2 (33%)
Усталость	4 (67%)
Одышка	5 (83%)
Тошнота или рвота	1 (17%)
Диарея	2 (33%)
Головная боль	1 (17%)
Сопутствующее нарушение - количество (%)	
Диабет	1 (17%)[#]
Артериальная гипертензия	1 (17%)
Дислипидемия	2 (33%)

Ожирение (ИМТ) ≥30 кг/м^2	2 (33%)
Избыточный вес ≥25 кг/м	4 (66%)
Тяжесть ОРДС при включении в исследование - количество (%)	
Легкая	3 (50%)
Средняя	2 (33%)
Тяжелая	1 (17%)
Время от госпитализации до начала лечения - дни, медиана (диапазон)	2 дня (1-4)
Время от установки CPAP до начала лечения - количество (%)	
0-24 часа	4 (67%)
24-48 часов	2 (33%)
Результаты рентгенологического исследования	
Патология на рентгеновских сниках грудной клетки - количество (%)	
Двусторонняя внутритканевая патология	6 (100%)
Результаты лабораторных исследований	
Отношение PaO2:FiO2 - медиана (диапазон)	175 (57,5-288)
Количество циркулирующих эндотелиальных клеток - медиана (диапазон)	334 (0-9315)
Количество лейкоцитов в мм^3, медиана (диапазон)	8335 (6420-10120)
>10000 в мм^3 - количество (%)	2 (33%)
<4000 за мм^3 - количество (%)	0 (0)
Количество лимфоцитов - в мм^3, медиана (диапазон)	875 (410-1290)
Количество тромбоцитов ×10^3 в мм^3, медиана (диапазон)	282 (199-390)
Гемоглобин - g/dL, медиана (диапазон)	13,4 (13,2-14,1)
Распределение других результатов исследования (лабораторные референсные диапазоны)	
С-реактивный белок (0,0-1,0 мг/дл)	14 (9,5-31,3)
Лактатдегидрогеназа (120/246 Ед/л)	518,5 (238-841)
Аспартатаминотрансфераза (13-40 Ед/л)	78,5 (51-141)
Аланиновая аминотрансфераза (7-40 Ед/л)	73 (37-183)
Креатинин (0,3-1,3 мг/дл)	0,85 (0,38-1,33)
D-димер* (<500 нг/мл)	1250,5 (943-1454)
Гаптоглобин (36-195 мг/дл)	368,5 (270-561)
Компонент комплемента C3** (79-152 мг/дл)	101 (60-126)
Компонент комплемента C4** (16-38 мг/дл)	21 (2-37)
Сопутствующая терапия	
Антиретровирусная терапия - количество (%)	
Дарунавир+Кобицистат	6 (100%)
Системная стероидная терапия - количество (%)	5 (83%)
После 1$^{й.}$ дозы нарсоплимаба	2 (33%)
После 2^{й} дозы нарсоплимаба	1 (17%)

После 3й дозы нарсоплимаба	1 (17%)
После 4й дозы нарсоплимаба	1 (17%)

ОРДС: острый респираторный дистресс-синдром; ОРИТ: Отделение реанимации и интенсивной терапии; CPAP: Постоянное положительное давление в дыхательных путях.
*: доступны данные только для 4 пациентов
**: доступны данные только для 5 пациентов
#несколько пациентов первоначально были отнесены к группе имеющих диабет, однако позже были переведены в группу имеющих избыточный вес, но не имеющих диабет.
определена как температура тела >37,5°C

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Тромбоз и повреждение эндотелиальных клеток у больных COVID-19

С 13 марта до 16 марта, вскоре после драматического начала вспышки COVID-19 в области Бергамо, Патологоанатомическое отделение больницы начало проводить вскрытия в первой группе из 20 умерших пациентов. До наступления смерти все эти пациенты, как и пациенты, получавшие нарсоплимаб в текущем исследовании, нуждались в интенсивной респираторной поддержке с применением CPAP или инвазивной искусственной вентиляции легких. В соответствии с клинической картиной часто смертельной легочной тромбоэмболии, было обнаружено, что легкие и печень многих пациентов были обширно поражены тромботическими процессами, как описано ниже.

На патогистологическом уровне вовлечение артерий в тромботический процесс наблюдалось в кровеносных сосудах альвеолярных перегородок легких у больных COVID-19, в том числе в участках, не затронутых деструктивным воспалительным процессом. Иммуногистохимическое окрашивание на CD34 (эндотелиальный маркер) продемонстрировало серьезное повреждение эндотелия со сморщиванием клеток, дегенерацией гидропической цитоплазмы и адгезией лимфоцитов на поверхности эндотелия, как показано на ФИГУРАХ 41A-D.

На ФИГУРАХ 41A-D показаны репрезентативные изображения иммуногистохимического анализа срезов тканей, взятых у больных COVID-19, показывающие повреждение сосудов у этих пациентов.

На ФИГУРЕ 41A показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани кровеносных сосудов альвеолярных перегородок легких больного COVID-19. Как показано на ФИГУРЕ 41A, артерии затронуты тромботическим процессом в кровеносных сосудах перегородок легкого; следует обратить внимание на первоначальную организацию тромба в просвете артерии (ГЭ, 400×).

На ФИГУРЕ 41B показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани кровеносных сосудов перегородок легких больного COVID-19. Как показано на ФИГУРЕ 41B, патологические признаки, аналогичные показанным на ФИГУРЕ 41A, заметны в большинстве сосудов альвеолярных

перегородок на большой площади легкого, не затронутой деструктивным воспалительным процессом (ГЭ, 400×).

На ФИГУРЕ 41C показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани средних кровеносных сосудов перегородки легкого у больного COVID-19. Как показано на ФИГУРЕ 41C, кровеносный сосуд среднего диаметра в перегородке легкого (обведен кружком) с полным тромбозом просвета; иммуногистохимическое коричневое окрашивание на CD34 (эндотелиальный маркер) продемонстрировало серьезное повреждение эндотелия со сморщиванием клеток, дегенерацией гидропической цитоплазмы (см. стрелку справа) и адгезией лимфоцитов на поверхности эндотелия (см. стрелку слева).

На ФИГУРЕ 41D показано репрезентативное изображение иммуногистохимического анализа срезов ткани паренхимы печени больного COVID-19. Как показано на ФИГУРЕ 41D, изменения сосудов также наблюдали в паренхиме печени с частичным тромбозом просвета крупных сосудов (ГЭ, 400×).

Идентификация и подсчет циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК)

Циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК) использовали в качестве биомаркера дисфункции эндотелиальных клеток (см. Farinacci M et al., Res Pract Thromb Haemost 3:49-58, 2019), при этом было показано, что количество ЦЭК повышено у пациентов с ОРДС, связанным с сепсисом, по сравнению с пациентами с сепсисом без ОРДС (Moussa M et al., Intensive Care Med 41(2):231-8, 2015). Также были опубликованы результаты в условиях острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), когда иммунно-опосредованная атака эндотелиальных клеток сосудов приводит к их отслоению от стенки сосуда и мобилизации в сосудистое русло (см., например, Almici et al., Bone Marrow Transplant 52:1637-1642, 2017).

На основе таких первоначальных наблюдений и опубликованных данных по острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), до начала исследования нарсоплимаба авторы изобретения начали измерять количество ЦЭК в произвольно выбранной когорте не участвующих в исследовании пациентов с молекулярно подтвержденным COVID-19, которые были случайно отобраны в нашей больнице. В этой группе из 33 не участвующих в исследовании больных COVID-19 было обнаружено, что ЦЭК/мл периферической крови (медиана 110, диапазон 38-877) были значительно повышены по сравнению со здоровыми субъктами из контрольной группы (медиана 7, диапазон 0-37 (P=0,0004), как показано на ФИГУРЕ 42A.

В этом исследовании количество ЦЭК/мл измеряли у больных COVID-19 до и после лечения нарсоплимабом. Как отмечали выше, примечательно, что было установлено, что количество ЦЭК/мл периферической крови (медиана 110, диапазон 38-877) было значительно повышено в независимой когорте больных COVID-19 по сравнению со здоровыми нормальными субъектами (медиана 7, диапазон 0-37) (см. ФИГ. 42A). Повышенное число ЦЭК/мл (медиана 334, диапазон 0-9315) также было подтверждено у шести пациентов, отобранных для лечения нарсоплимабом. После

лечения нарсоплимабом было зарегистрировано быстрое снижение числа ЦЭК/мл после первых двух доз (медиана 92 ЦЭК/мл, диапазон 18-460) и подтверждено после четвертой дозы (медиана 73, диапазон 0-593), как показано на ФИГ. 42B. Дополнительно было подтверждено, что число ЦЭК/мл также уменьшилось после введения шестой дозы нарсоплимаба (медиана 59, диапазон 15-276) (данные не показаны на ФИГУРЕ 42B).

На ФИГУРЕ 42A графически проиллюстрировано количество ЦЭК/мл у нормальных здоровых лиц из контрольной группы (n=6) по сравнению с количеством ЦЭК/мл у больных COVID-19, которые не участвовали в этом исследовании (n=33). Как показано на ФИГУРЕ 42A, по сравнению со здоровыми нормальными субъектами было определено, что количество ЦЭК/мл было значимо повышено в этой независимой когорте больных COVID-19.

На ФИГУРЕ 42B графически проиллюстрировано количество ЦЭК/мл у 6 пациентов, отобранных для этого исследования, до (исходное состояние) и после лечения нарсоплимабом, квадраты обозначают значения от первого до третьего квартиля, горизонтальная линия показывает среднее значение, и усы указывают минимальное и максимальное значение. Как показано на ФИГУРЕ 42B, повышение ЦЭК/мл также было подтверждено у шести пациентов, отобранных для лечения нарсоплимабом, которое быстро снижалось после лечения нарсоплимабом.

Поскольку наша больница разработала рекомендации по стандартному применению стероидов у больных COVID-19 через 16 дней после начала этого исследования, лечение стероидами было назначено пяти из шести пациентов в рамках поддерживающей терапии, начиная со 2-10 дней после начала приема нарсоплимаба. По этой причине количество ЦЭК/мл также оценивали в отдельной группе из четырех пациентов (женщин, средним возрастом 83 года с диапазоном от 62 до 90 лет, трое нуждались в кислородной маске и одна на CPAP), которые получали только стероиды. Было обнаружено, что у этих четырех пациентов количество ЦЭК, оцениваемое через 48 часов, не зависит от введения стероидов (p=0,38). У двух дополнительных пациентов, получавших только стероиды, количество ЦЭК оценивали в исходном состоянии и через 4 недели поддерживающей терапии, включавшей стероиды. У первой пациентки, у которой прогрессирующе ухудшалось клиническое течение, количество ЦЭК не изменилось (271/мл и 247/мл), тогда как у второй клиническое улучшение сопровождалось одновременным снижением ЦЭК (165 и 65/мл).

У шести пациентов, получавших нарсоплимаб, ЦЭК/мл были заметно повышены в исходном состоянии (медиана 334, диапазон 0-9315). С применением нарсоплимаба число ЦЭК быстро снижалось после второй (медиана 92 ЦЭК/мл, диапазон 18-460), четвертой (медиана 72,5, диапазон 0-593) и шестой (медиана 59, диапазон 15-276) доз лечения (p=0,01). Концентрации IL-6, IL-8, СРБ и ЛДГ в сыворотке также заметно снижались при лечении нарсоплимабом, как описано ниже.

Уровни С-реактивного белка (СРБ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и цитокинов в сыворотке

На ФИГУРЕ 43 графически проиллюстрирован уровень С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке (медиана; межквартильный размах (МКР)) у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в разное время после лечения нарсоплимабом. Как показано в Таблице 13, уровень СРБ в сыворотке здоровых субъектов находится в диапазоне (0,0-1,0 мг/дл), а медианный уровень СРБ у 6 больных COVID-19 до начала лечения составлял 14 мг/дл. Как показано на ФИГУРЕ 43, после 2 недель лечения нарсоплимабом уровень СРБ у 6 больных COVID-19 снизился до медианного уровня почти 0,0 мг/дл, что находится в пределах нормы для здоровых субъектов.

На ФИГУРЕ 44 графически проиллюстрирован уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке (медиана; МКР) у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в разное время после лечения нарсоплимабом. Как показано в Таблице 13, уровень ЛДГ в сыворотке здоровых субъектов находится в диапазоне (120-246 ЕД/л), а у 6 больных COVID-19 медианный уровень ЛДГ до начала лечения составлял 518 ЕД/л. Как показано на ФИГУРЕ 44, через 2 недели лечения нарсоплимабом уровень ЛДГ у больных COVID-19 снизился до среднего уровня около 200 ЕД/л, что находится в пределах нормы для здоровых субъектов.

На ФИГУРЕ 45 графически проиллюстрирован уровень интерлейкина 6 (IL-6) пг/мл (медиана; межквартильный размах (МКР)) в сыворотке у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в разное время после лечения нарсоплимабом. Как показано на ФИГУРЕ 45, медианный уровень IL-6 у больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения составлял приблизительно 180 пг/мл. После 1 дозы нарсоплимаба (предварительная доза 2) медианный уровень IL-6 у больных COVID-19 снизился до приблизительно 40 пг/мл, а после 2 доз нарсоплимаба (предварительная доза 3) медианный уровень IL-6 у пациентов с COVID-19 еще снизился до приблизительно 10 пг/мл.

На ФИГУРЕ 46 графически проиллюстрирован уровень интерлейкина 8 (IL-8) пг/мл (медиана; межквартильный размах (МКР)) в сыворотке у 6 больных COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в разное время после лечения нарсоплимабом. Лечение нарсоплимабом проводили в День 1, День 4, День 7, День 11 и День 14. Как показано на ФИГУРЕ 46, медианный уровень IL-8 у больных COVID-19 в начале лечения составлял приблизительно 30 пг/мл. После 1 дозы нарсоплимаба (предварительная доза 2) медианный уровень IL-8 у больных COVID-19 снизился до приблизительно 20 пг/мл, а после 2 доз нарсоплимаба (предварительная доза 3) медианный уровень IL-8 у больных COVID-19 еще снизился до приблизительно 15 пг/мл.

Клинические результаты после лечения нарсоплимабом

Клинические характеристики 6 пациентов, отобранных для лечения нарсоплимабом, приведены в Таблице 13. Медианный возраст составлял 56,5 лет, и большинство пациентов были мужчинами (83%). Все пациенты имели избыточный вес или ожирение согласно индексу массы тела (ИМТ) ≥25 и ≥30 соответственно. На момент включения в исследование у всех пациентов была пневмония/ОРДС, требующий CPAP,

причем у двух пациентов состояние быстро ухудшалось, и им потребовалась интубация вскоре после включения в исследование. Лечение нарсоплимабом начинали в течение 48 часов после начала неинвазивной вентиляции с CPAP. Краткое изложение клинических результатов, наблюдаемых у этих пациентов, получавших нарсоплимаб, представлено ниже в Таблице 14, которая была дополнена для отражения состояния пациента после лечения. Пациенты получали нарсоплимаб два раза в неделю. После лечения респираторный дистресс-синдром у 4 пациентов (67%) уменьшился, при этом поддержку искусственной вентиляцией легких с CPAP снижали до высокопоточной оксигенации после введения в среднем 3 доз нарсоплимаба (диапазон 2-3). Затем кислородную поддержку уменьшали и прекращали до выписки у 3 пациентов. Как показала КТ с контрастным усилением, у пациента #4 развилась массивная легочная эмболия на 4-й день после начала лечения. По этой причине добавили низкомолекулярный гепарин поверх продолжающегося лечения нарсоплимабом, и через 7 дней было зарегистрировано быстрое улучшение клинической картины и картины КТ. У двух последних пациентов (#5 и #6) вскоре после включения в исследование было зарегистрировано быстрое и прогрессирующее ухудшение тяжелого ОРДС. В случае #5 тяжелый ОРДС (со значением PiO2/FiO2 57) привел к необходимости интубации пациента на 4-й день. Тем не менее, последующий клинический результат быстро становился благоприятным, и пациент был выписан из отделения интенсивной терапии через 3 дня. После 2 дней CPAP он находился в стабильном состоянии с низкопоточной кислородной поддержкой. В случае #6, через 4 дня после включения в исследование развился тяжелый ОРДС, и пациенту потребовалась интубация. Как и в предыдущем случае, ей снова сделали CPAP, а затем высокопоточную оксигенацию из-за быстрого клинического улучшения, и впоследствии выписали.

В этом исследовании не зарегистрировали нежелательных явлений, связанных с лечением.

ТАБЛИЦА 14: Результаты лечения пациентов до настоящего времени

Пациент	**Введение нарсоплимаба**	**Результаты до настоящего времени**
1	6 доз	Прекращение CPAP в течение 1 недели после начала лечения, выписка в День 18, стероиды не применяли
2	5 доз	Прекращение CPAP в течение 1 недели после начала лечения, применение стероидов начинали в день 10, выписка в День 16
3	5 доз *обновлено: 7 доз	Находился дома больше 1 недели с быстро прогрессирующим респираторным дистресс-синдромом перед поступлением; отмена CPAP в течение 11 дней после начала лечения, применение стероидов начинали в день 10, выписка в День 22*
4	4 дозы на данный момент, введение продолжается **обновлено: 8 доз	Течение осложнено множественными легочными тромбами, обнаруженными до лечения нарсоплимабом; применение стероидов начинали в день 1, развитие легочной эмболии в день 4, улучшение в день 7 на КТ высокого разрешения, прекращение CPAP в течение 12 дней, стабилизация

		на нарсоплимабе, сохраняется улучшение, и введение продолжают. **обновлено: назальная канюля в день 26, самостоятельное дыхание в палате в день 28 и выписка в день 33.
5	3 дозы на данный момент, введение продолжается ***обновлено: 8 доз	Начало применения стероидов в день 3, смог получить только 2 дозы нарсоплимаба, после чего потребовалась интубация и перевод в ОРИТ в день 4; стабилизация на нарсоплимабе, улучшение, экстубация и перевод в обычную палату снова на CPAP в День 7, прекращение CPAP в день 9, сохранение улучшения и продолжение введения препарата. ***обновлено: назальная канюля в день 25, самостоятельное дыхание в палате в день 27 и выписка в день 33.
6	3 дозы на данный момент, введение продолжается ****обновлено: 8 доз	Начало применения стероидов в день 1, смог получить только 1 дозу нарсоплимаба, после чего потребовалась интубация и перевод в ОРИТ в день 3, стабилизация на нарсоплимабе при сохранении интубации; улучшение и продолжение введения препарата. ****обновлено: экстубация и перевод на CPAP в день 20, прекращение CPAP в день 82 и перевод на назальную канюлю, самостоятельное дыхание в палате в день 85, выписка в день 90.

*, **, ***, **** см. обновленные данные о пациентах 3-6, описанные ниже.

Обсуждение

Результаты этого исследования показывают, что повреждение эндотелия и тромбоз занимают центральное положение в патофизиологии повреждения легких при COVID-19. Пациенты с тяжелой дыхательной недостаточностью демонстрировали не только заметно повышенные уровни СРБ, ЛДГ, IL-6 и IL-8, но и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК). Это новое наблюдение согласуется с результатами патогистологических исследований в легких и печени, которые показали заметное повреждение эндотелия и тромбоз у пациентов с COVID-19. Полиорганные микрососудистые патогистологические изменения, в особенности образование микрососудистых тромбов, напоминают картину при ТГСК-ТМА, что еще раз подтверждает роль повреждения эндотелия при поражении легких, связанном с COVID-19. Известно, что повреждение эндотелия является основным компонентом патофизиологии активации комплемента, которая присутствует при ОРДС (Thompson BT, et al., N Engl J Med, 377(6):562-572, 2017). Об активации комплемента также сообщали в моделях SARS и MERS, при этом она важна при других состояниях, характеризующихся повреждением эндотелия. Повреждение эндотелия, первопричина повышенной проницаемости капилляров и отека легких при ОРДС, также может вызывать микрососудистую ангиопатию и тромбоз.

Система комплемента является важной частью иммунной системы. Три пути активируют комплемент в ответ на разные инициирующие события: классический, лектиновый и альтернативный пути. Лектиновый путь комплемента является частью

врожденного иммунного ответа. В системе распознавания паттернов активация лектинового пути инициируется представителями семейства ферментов MASP (MASP-1, MASP-2 и MASP-3). Эти протеазы синтезируются в виде проферментов, которые образуют в крови комплексы с лектинами, в частности с маннан-связывающим лектином (МСЛ), фиколинами и коллектинами. Эти лектины распознают и связываются с углеводными паттернами, присутствующими на поверхности патогенных микроорганизмов или поврежденных клеток-хозяев, направляя протеазы MASP в их участок(ки) действия и вызывая их активацию. Таким образом, активация лектинового пути происходит на поверхности поврежденных эндотелиальных клеток. Как описано в Примере 20, ожидалось, что активация лектинового пути будет происходить в условиях связанного с COVID-19 повреждения эндотелия.

MASP-2 является ключевым ферментом, который отвечает за активацию лектинового пути. После активации, MASP-2 расщепляет компонент комплемента 2 (C2) и C4, инициируя серию ферментативных реакций, которые приводят к активации C3 и C5 с образованием анафилатоксинов C3a и C5a, и образование C5b-9 (мембраноатакующего комплекса). В доклинических условиях C3a и C5a индуцировали эндотелиальную активацию, ассоциированную с повреждением эндотелия и провоспалительными изменениями, накоплением лейкоцитов и апоптозом эндотелия. Мембраносвязанный C5b-9 также может вызывать лизис клеток. Даже в сублитическом состоянии C5b-9 вызывает дополнительное повреждение клеток, которое вызывает секрецию протромботических факторов, активацию тромбоцитов, активацию молекул адгезии и дисфункциональные морфологические изменения в эндотелии (Kerr H, Richards A. Immunobiology 217(2):195-203, 2012). Такие активности, опосредованные комплементом, могут усиливать повреждение и дисфункцию эндотелия, вызывая или ухудшая клиническое состояние. В недавней публикации Gao et al. сообщается о ключевой роли MASP-2 и лектинового пути в патофизиологии SARS и MERS в моделях на животных. MASP-2, ключевой фермент, ответственный за активацию лектинового пути, связывается с N-белком COVID-19 и подвергается активации (Gao et al., medRxiv 2020, 2020.03.29.20041962), и был обнаружен в микроциркуляторном русле легочной ткани у пациентов с тяжелой формой COVID-19 (Magro C., et al., Transl Res 2020; doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007). Активированный MASP-2 инициирует серию ферментативных реакций, которые приводят к образованию анафилатоксинов C3a и C5a и формированию мембраноатакующего комплекса C5b-9 (Dobo et al., Front Immunol 9:1851, 2018), что может индуцировать провоспалительные процессы и вызвать лизис и гибель клеток. MASP-2 также может непосредственно расщеплять C3, не задействуя C4 (Yaseen S. et al., FASEB J 31(5):2210-9, 2017). Важно отметить, что MASP-2 действует до лектинового пути, поэтому ингибирование MASP-2 не влияет на литическую часть классического пути (т.е. C1r/C1s-направляемое образование C3 и C5 конвертаз), сохраняя адаптивный иммунный ответ, необходимый для борьбы с инфекцией (Schwaeble et al., Proc Natl Acad Sci 108(18):7523-8, 2011).).

Помимо своей роли в системе комплемента, MASP-2 действует непосредственно на

коагуляционный каскад и систему контактов, расщепляя протромбин до тромбина и образуя фибриновые сгустки (Gulla K.C., Immunology 129(4):482-95, 2010; Krarup A. et al., PLoS One 2(7):e623, 2007). Нарсоплимаб не только ингибирует активацию лектинового пути, но также блокирует связанное с повреждением микрососудов образование тромбов, а также MASP-2-опосредованную активацию калликреина и фактора XII, как описано в WO 2019246367, включенной в настоящий документ посредством отсылки. Эти активности могут способствовать благоприятному эффекту за счет ингибирования тромбоза микрососудов, что может играть важную терапевтическую роль у пациентов, получавших нарсоплимаб, особенно у пациентов с обширными легочными тромбозами. Нарсоплимаб не удлиняет время кровотечения и не влияет на протромбиновое время или активированное частичное тромбопластиновое время, и у пациентов, получавших нарсоплимаб, кровотечений не наблюдали. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, считается, что нарсоплимаб может блокировать коагуляцию, возникающую в результате повреждения эндотелия (связанную с активацией фактора XII), но не коагуляцию, связанную с внеклеточным матриксом (управляемую фактором VII).

Ингибирование лектинового пути ранее не исследовали в качестве лечения COVID-19. Все пациенты в этом исследовании имели дыхательную недостаточность, связанную с COVID-19. В текущем исследовании ингибирование MASP-2 и лектинового пути нарсоплимабом было связано с клиническим улучшением и выживаемостью у всех пациентов с COVID-19, получавших лекарственное средство. После лечения ингибитором MASP-2 нарсоплимабом все шесть пациентов выздоровели и могли быть выписаны из больницы. Клиническое улучшение, наблюдаемое у пациентов, страдающих дыхательной недостаточностью, связанной с COVID-19, после лечения нарсоплимабом, который ингибирует активацию MASP-2 и лектинового пути, еще раз подтверждает важную роль лектинового пути в патофизиологии COVID-19. Как описано в этом Примере, все шесть пациентов с COVID-19 продемонстрировали клиническое улучшение после лечения нарсоплимабом. В каждом случае повреждение легких при COVID-19 прогрессировало до ОРДС до лечения нарсоплимабом, и все пациенты получали неинвазивную механическую вентиляцию легких, начатую у каждого с момента госпитализации. У двух пациентов наблюдали продолжающееся ухудшение состояния после введения первой дозы нарсоплимаба, и им потребовалась инвазивная искусственная вентиляция легких. Оба этих пациента впоследствии смогли полностью прекратить искусственную вентиляцию легких, продолжив лечение нарсоплимабом. У двух пациентов (один интубирован, а другой на CPAP) развились обширные двусторонние тромбозы легких, и оба пациента полностью выздоровели при применении нарсоплимаба, вероятно, благодаря антикоагулянтному действию лекарственного средства. Временные профили лабораторных маркеров (ЦЭК, IL-6, IL-8, СРБ и ЛДГ) соответствовали наблюдаемому клиническому улучшению и предполагаемому механизму действия нарсоплимаба. В частности, количество ЦЭК представляется надежным инструментом для оценки повреждения эндотелия и ответа на лечение при этом заболевании. Примечательно, что

улучшение уровней IL-6 и IL-8 также коррелирует во времени с лечением нарсоплимабом, что позволяет предположить, что активация лектинового пути может предшествовать усилению цитокинового шторма при COVID-19, и что ингибирование лектинового пути оказывает потенциальное благоприятное воздействие на цитокиновый шторм, описанный у пациентов с инфекцией COVID-19 (Xiong Y, et al., Emerg Microbes Infect 9(1):761-770, 2020). Первоначально было запланировано введение нарсоплимаба в течение двух недель, но оно было увеличено до 3-4 недель после повышения ЦЭК у пациента #1 при первом прекращении введения препарата. После 3-4 недель лечения нарсоплимабом возобновления признаков и симптомов в легких не наблюдали. Не было обнаружено признаков нарушения вирусной защиты у пациентов, получавших нарсоплимаб, и не наблюдали нежелательных явлений, связанных с нарсоплимабом. Примечательно, что нарсоплимаб не ингибирует альтернативный или классический пути комплемента и не влияет на адаптивный иммунный ответ или образование комплексов антигена-антитела. В клинических исследованиях не наблюдали никаких доказательств риска инфекции, связанной с нарсоплимабом. В дополнение к ингибированию активации лектинового пути было продемонстрировано, что нарсоплимаб блокирует MASP-2-опосредованное расщепление протромбина до тромбина (Krarup A, et al., PLoS One; 2(7):e623, 2007), активацию калликреина и аутоактивацию фактора XII до XIIa. Эти действия могут способствовать благоприятным эффектам за счет ингибирования тромбоза микрососудов. Нарсоплимаб не увеличивает время кровотечения и не влияет ни на протромбиновое время, ни на активированное частичное тромбопластиновое время. (Krarup PLoS One 2007)

Результаты, описанные в этом Примере, убедительно указывают на то, что MASP-2-опосредованная активация лектинового пути вызвана повреждением эндотелия в патофизиологии повреждения легких, связанного с COVID-19. После лечения нарсоплимабом заметно улучшение клинического статуса и показателей лабораторных исследований. Эти результаты убедительно свидетельствуют о значимой клинической эффективности с подтверждающим доказательством, связанным с механизмом действия лекарственного средства и патофизиологией заболевания. Ингибирование лектинового пути нарсоплимабом, по-видимому, представляет многообещающее перспективное лечение повреждения легких, связанного с COVID-19.

Дополнительные данные из клинического исследования, описанного в этом Примере

Как описано выше в этом Примере, шесть пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 и ОРДС (в соответствии с Берлинскими критериями) получали нарсоплимаб (4 мг/кг внутривенно (в/в), два раза в неделю в течение 3-4 недель. Все пациенты получали стандартную поддерживающую терапию, включая профилактический эноксапарин (Клексан, Sanofi Aventis) 4000 МЕ/0,4 мл, азитромицин (Зитромакс, Pfizer SpA, Italy) 500 мг 1 раз в день, гидроксихлорохин (Плаквенил, Sanofi Aventis) 200 мг 2 раза в день, дарунавир и кобицистат (Резолста, Janssen-Cilag S.p.A., Italy)

800/150 мг 1 раз в день. Начиная с 27 марта, в соответствии с обновленными рекомендациями, действующими в учреждении, все пациенты с Covid-19 в нашей больнице получали метилпреднизолон (1 мг/кг), который вводили 5 из 6 пациентов, получавших нарсоплимаб.

Патогистологическую оценку проводили у умерших больных COVID-19, которые не получали нарсоплимаб. Клинические и лабораторные показатели, включая общий анализ крови, уровни ЛДГ и СРБ, собирали в соответствии со стандартной практикой у пациентов, получавших нарсоплимаб, и пациентов, не получавших нарсоплимаб. Стандартные анализы крови собирали перед введением каждой дозы нарсоплимаба, а затем два раза в неделю. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток и уровни IL-6 и IL-8 оценивали периодически с помощью проточной цитометрии. Дыхательную функцию оценивали ежедневно. Все пациенты проходили компьютерную томографию (КТ) грудной клетки при поступлении в стационар для документирования интерстициальной пневмонии и, при наличии клинических показаний, во время госпитализации для документирования тромбоэмболии легочной артерии. Рентгенографию грудной клетки также проводили по клиническим показаниям.

Данные представлены как частота в процентах для категориальных переменных и медиана с диапазоном для непрерывных переменных. Различия в клинических и лабораторных показателях между временными точками оценивали с помощью непараметрического критерия Фридмана. Парные сравнения проводили при использовании критерия знаковых рангов Уилкоксона для парных измерений. Была зафиксирована значимость на уровне 5%. Анализ проводили с использованием программы R (версии 3.6.2).

Как описано в этом Примере, вскрытие проводили у первой группы из 20 умерших больных COVID-19. В соответствии с клинической картиной часто летальной тромбоэмболии легочной артерии у большинства пациентов обнаруживали обширные тромбозы в легких и печени. Гистологически выявлены артериальные тромбозы в сосудах перегородок легких, в том числе в областях, не затронутых деструктивным воспалительным процессом. Иммуногистохимическое окрашивание на CD34 (маркер эндотелиальных клеток) продемонстрировало серьезное повреждение эндотелия со сморщиванием клеток, дегенерацией гидропической цитоплазмы и адгезией лимфоцитов на эндотелиальных клетках, как показано на ФИГУРАХ 41A-D.

Как описано в этом Примере, ингибирование лектинового пути комплемента нарсоплимабом в этом исследовании было связано с клиническим улучшением. Лечение нарсоплимабом было ассоциировано с быстрым и устойчивым снижением ЦЭК параллельно с сопутствующим снижением IL-6, IL-8, СРБ и ЛДГ в сыворотке. В частности, количество ЦЭК представляется надежным инструментом для оценки повреждения эндотелия и ответа на лечение при этом заболевании. Временное улучшение IL-6 и IL-8 при лечении нарсоплимабом указывает на потенциальное положительное влияние на цитокиновый шторм, описанный у пациентов с инфекцией Covid-19 (Xiong Y,

et al., Emerg Microbes Infect 9(1):761-770, 2020). Результаты этого исследования указывают, что повреждение эндотелия занимает центральное положение в патофизиологии повреждения легких, связанного с COVID-19. Пациенты с тяжелой дыхательной недостаточностью демонстрируют не только заметно повышенные уровни С-реактивного белка (СРБ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), но также повышение IL-6, IL-8 и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК). Это новое наблюдение согласуется с патогистологическими данными в легких и печени, показывающими выраженное повреждение эндотелия и тромбоз у больных COVID-19. Патогистологические изменения микрососудов очень похожи на таковые при синдроме повреждения эндотелия ТГСК-ТМА, что еще раз подтверждает роль повреждения эндотелия при поражении легких, связанном с COVID-19.

Первоначально запланировали двухнедельное введение доз, однако его увеличили до 3-4 недель после повышения ЦЭК у пациента #1 при первом прекращении введения препарата. На третьей неделе приема количество ЦЭК у пациента снова снизилось. После 4 недель лечения нарсоплимабом возобновления признаков и симптомов в легких не наблюдали. Не было обнаружено признаков нарушения вирусной защиты у пациентов, получавших нарсоплимаб. Примечательно, что нарсоплимаб не ингибирует классический или альтернативный путь комплемента и не влияет на адаптивный иммунный ответ или образование комплексов антигена-антитела. В клинических исследованиях не наблюдали никаких доказательств риска инфекции, связанной с нарсоплимабом. Было показано, что в дополнение к ингибированию активации лектинового пути нарсоплимаб блокирует MASP-2-опосредованное расщепление протромбина до тромбина, активацию калликреина и аутоактивацию фактора XII до XIIa. Эти активности могут способствовать благоприятным эффектам в результате ингибирования тромбоза микрососудов, и это может сыграть важную терапевтическую роль, особенно у тех пациентов, которые страдают обширным легочным тромбозом. Нарсоплимаб не удлиняет время кровотечения и не влияет на протромбиновое время или активированное частичное тромбопластиновое время, при этом у пациентов, которые проходили экспериментальное лечение, кровотечений не наблюдали.

Наши выводы убедительно указывают на то, что активация лектинового пути вызвана повреждением эндотелия, в патофизиологии повреждения легких, связанного с Covid-19. Ингибирование лектинового пути комплемента нарсоплимабом было связано с клиническим улучшением у всех пациентов в этом исследовании. Нарсоплимаб хорошо переносился, о нежелательных реакциях, связанных с лекарственным средством, не сообщали. Все пациенты на фоне лечения продемонстрировали улучшение и выжили. После лечения нарсоплимабом заметно улучшение клинического состояния и результатов лабораторных исследований. Эти результаты убедительно свидетельствуют о значимой клинической эффективности с подтверждающим доказательством, связанным с механизмом действия лекарственного средства и патофизиологией заболевания. Ингибирование лектинового пути нарсоплимабом, по-видимому, представляет

многообещающее перспективное лечение повреждения легких, связанного с Covid-19.

Дополнительные данные получены из клинического исследования, описанного в этом Примере.

Клинические характеристики 6 пациентов, получавших нарсоплимаб, приведены в Таблице 13. Нарсоплимаб в дозе 4 мг/кг вводили внутривенно, два раза в неделю в течение 3-4 недель. После лечения у всех пациентов наблюдали клиническое улучшение.

У 4 пациентов эноксапарин вводили в терапевтических дозах (100 МЕ/кг два раза в день) в связи с задокументированной на снимке КТ тромбоэмболией легочной артерии (пациенты #4 и #6), решением врача (пациент #3) и быстрым ухудшением дыхательной функции, требующим интубации (пациент #5). Медианное последующее наблюдение составило 27 дней (16-90), при этом пациенты получали нарсоплимаб два раза в неделю, с медианой в общей сложности 8 доз нарсоплимаба (диапазон 5-8). После лечения у всех пациентов наблюдали клиническое улучшение. Четыре пациента (67%) продемонстрировали уменьшение респираторной поддержки с CPAP на высокопоточную оксигенацию (с нереверсивной кислородной маской или кислородной маской Вентури) в среднем после 3 доз нарсоплимаба (диапазон 2-3).

На ФИГУРЕ 50 графически проиллюстрирован клинический результат лечения шести пациентов, инфицированных COVID-19, получавших нарсоплимаб.

Как показано на ФИГУРЕ 50, у 3 из этих пациентов кислородную поддержку прекратили, а затем отменили, и они были выписаны после медианного числа 6 (5-8) общих доз нарсоплимаба.

У пациента #4 обширная двусторонняя легочная тромбоэмболия была задокументирована с помощью КТ-сканирования с контрастным усилением через 4 дня после включения в исследование. Эноксапарин добавляли к продолжающемуся введению нарсоплимаба, при этом быстрое клиническое и рентгенологическое (повторное КТ-сканирование) улучшение было задокументировано через 11 дней (ФИГУРА 47A и ФИГУРА 47B), и впоследствии пациент был выписан.

У 2 оставшихся пациентов (#5 и #6) вскоре после включения в исследование было задокументировано быстрое и прогрессирующее ухудшение тяжелого ОРДС.

У пациента #5 тяжелый ОРДС (PaO2/FiO2 55) привел к интубации на 4-й день. Тем не менее, последующие клинические результаты быстро улучшались, и пациент был выписан из отделения интенсивной терапии через 3 дня. После 2 дней CPAP, состояние пациента было стабилизировано на низкопоточной кислородной поддержке. Впоследствии пациент не нуждался в кислороде и был выписан.

Пациент #6 имел показатель PaO2/FiO2 60 и тяжелый ОРДС на момент включения в исследование, и ему потребовалась интубация через 2 дня. Течение болезни у пациентки осложнилось обширным двусторонним тромбозом легких и внутрибольничной инфекцией, вызванной метициллинрезистентным Staphylococcus aureus (MRSA). Ее состояние улучшилось, и через 18 дней ее экстубировали, трахеостомировали (из-за клаустрофобии) и проводили поддержку низкопоточным кислородом. Ее состояние

улучшилось, кислородную поддержку отменили, и на 90-е сутки она была выписана (день 33 по 90 день не показаны на ФИГУРЕ 50)

В этом исследовании о связанных с лечением нежелательных явлениях не сообщали.

Как описано выше, у пациента #4 обширная двусторонняя легочная тромбоэмболия была задокументирована с помощью КТ-сканирования с контрастным усилением через 4 дня после включения в исследование. Эноксапарин добавляли к продолжающемуся введению нарсоплимаба, и через 11 дней было задокументировано быстрое клиническое и рентгенологическое (повторное КТ-сканирование) улучшение, как показано на ФИГУРЕ 47A, B.

ФИГУРА 47A и ФИГУРА 47B представляют собой изображения КТ-сканов легких пациента #4 с пневмонией, вызванной COVID-19, получавшего лечение нарсоплимабом.

На ФИГУРЕ 47A показан КТ-снимок пациента #4 в день 5 с момента включения в исследование (т.е. после лечения нарсоплимабом), где у пациента наблюдается тяжелая интерстициальная пневмония с диффузным затемнением по типу матового стекла, затрагивающим как периферическую, так и центральную области. Затемнение в нижних долях, особенно в левом легком. Обширная двусторонняя легочная тромбоэмболия с дефектами наполнения междолевых и сегментарных артерий (не показана).

На ФИГУРЕ 47B показан КТ-снимок пациента #4 в день 16 с момента включения в исследование (т.е. после лечения нарсоплимабом), на котором затемнение по типу матового стекла значительно уменьшилось с практически полным исчезновением затемнения паренхимы. Паттерн "булыжной мостовой" наблюдали при периферическом распространении, особенно в нижних долях. Выраженный пневмомедиастинум. Минимальные дефекты наполнения субсегментарных артерий правого легкого (не показаны).

На ФИГУРЕ 48 графически проиллюстрированы уровни IL-6 (пг/мл) в сыворотке в исходном состоянии и в различное время после лечения нарсоплимабом (после 2 доз, после четырех доз) у пациентов, получавших нарсоплимаб. Квадраты представляют значения с первого по третий квартиль, горизонтальная линия показывает среднее значение, а точки показывают значения всех пациентов. На ФИГУРЕ 48 представлено обновление данных IL-6, показанных на ФИГУРЕ 45.

На ФИГУРЕ 49 графически проиллюстрированы уровни IL-8 (пг/мл) в сыворотке в исходном состоянии и в различное время после лечения нарсоплимабом (после двух доз, после 4 доз) у пациентов, получавших нарсоплимаб. Квадраты представляют значения с первого по третий квартиль, горизонтальная линия показывает среднее значение, а точки показывают значения всех пациентов. На ФИГУРЕ 49 представлено обновление данных IL-8, показанных на ФИГУРЕ 46.

На ФИГУРЕ 50 графически проиллюстрирован клинический результат шести пациентов, инфицированных COVID-19, получавших нарсоплимаб. Цвета столбцов указывают на различную кислородную поддержку (CPAP: желтый; искусственная

вентиляция легких с интубацией: красный; нереверсивная кислородная маска: зеленый; низкопоточный кислород через назальную канюлю: светло-зеленый; комнатный воздух: синий). Дозы нарсоплимаба отмечены синими стрелками. Черный кружок указывает на начало лечения стероидами. Ромб указывает на ТЭЛА. Звездочками (*) обозначены выписанные из больницы. CPAP=постоянное положительное давление в дыхательных путях. HPM=нереверсивная кислородная маска. MB=маска Вентури. ТЭЛА=тромбоэмболия легочной артерии.

На ФИГУРЕ 51A графически проиллюстрированы значения уровней аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке (единиц/литр, Ед/л) до и после лечения нарсоплимабом. Черные линии представляют медиану и межквартильный размах (МКР). Красная линия представляет уровень нормы, а точки указывают значения всех пациентов.

На ФИГУРЕ 51B графически проиллюстрирован значения уровней D-димера в сыворотке (нг/мл) четырех пациентов, у которых исходные значения были доступны до начала лечения нарсоплимабом. Черные кружки указывают, когда было начато лечение стероидами. Красная линия представляет уровень нормы.

Таким образом, в этом исследовании ингибитор лектинового пути впервые применялся для лечения COVID-19, шесть больных COVID-19 с ОРДС, требующих постоянного положительного давления в дыхательных путях (CPAP) или интубации, получали нарсоплимаб. Средний возраст пациентов составил 57 лет (от 47 до 63 лет), 83% мужчины, и все имели сопутствующие заболевания. В исходном состоянии количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) и уровни интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8), С-реактивного белка (СРБ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), D-димера и аспартатаминотрансаминазы (АСТ) в сыворотке - маркеров эндотелиального/клеточного повреждения и/или воспаления - были значительно повышены. Лечение нарсоплимабом начинали в течение 48 часов после начала искусственной вентиляции легких. Введение препарата производили два раза в неделю в течение двух-четырех недель.

Результаты исследования

- Все пациенты, получавшие нарсоплимаб, полностью выздоровели, выжили и были выписаны из больницы.
- Лечение нарсоплимабом было ассоциировано с быстрым и устойчивым снижением/нормализацией всех оцениваемых маркеров эндотелиального/клеточного повреждения и/или воспаления - ЦЭК, IL-6, IL-8, СРБ, ЛДГ, D-димера и АСТ.

o Динамика лабораторных маркеров соответствовала наблюдаемому клиническому улучшению.

o В частности, количество ЦЭК представляется надежным инструментом для оценки повреждения эндотелия и ответа на лечение при этом заболевании.

o Временное улучшение IL-6 и IL-8 при лечении нарсоплимабом позволяет предположить, что активация лектинового пути может предшествовать повышению уровня цитокинов при COVID-19, и что ингибирование лектинового пути оказывает благоприятное влияние на цитокиновый шторм, описанный у пациентов с инфекцией

COVID-19.

• Течение болезни у двух пациентов (один интубирован, а другой на CPAP) было дополнительно осложнено обширными двусторонними легочными тромбозами, и оба пациента полностью выздоровели с помощью нарсоплимаба, возможно, благодаря антикоагулянтным эффектам этого лекарственного средства.

• Нарсоплимаб хорошо переносился в исследовании, и о нежелательных явлениях, связанных с лекарственным средством, не сообщали.

• Для ретроспективного сравнения использовали две контрольные группы с аналогичными критериями отбора и исходными показателями, в которых зарегистрировали значительный уровень смертности 32 процента и 53 процента.

Выводы

Как показано в этом Примере, ингибирование лектинового пути комплемента при применении нарсоплимаба может представлять эффективное лечение больных Covid-19 за счет уменьшения связанного с Covid-19 повреждения эндотелиальных клеток и, следовательно, воспалительного статуса и риска тромбообразования. Ингибирование лектинового пути ранее не исследовали в качестве лечения COVID-19. Все пациенты в этом исследовании имели дыхательную недостаточность, связанную с COVID-19. После лечения ингибитором MASP-2 нарсоплимабом все пациенты выздоровели и были выписаны из больницы, что еще раз подтверждает важность лектинового пути в патофизиологии COVID-19.

Сообщали о применении других ингибиторов комплемента при COVID-19. AMY-101, ингибитор C3 на основе компстатина (Mastaglio S. et al., Clin Immunol 215:108450, 2020), применяли у одного пациента, а экулизумаб вводили вместе с противовирусной и антикоагулянтной терапией четырем пациентам (Diurno F. et al. ., Eur Rev Med Pharmacol Sci 24(7):4040-7, 2020. Эти пять пациентов находились на CPAP и выжили. Два больных COVID-19 на высокопоточном назальном кислороде получали антитело к C5a в сочетании с поддерживающей терапией, включая противовирусную терапию, с последующей терапией стероидами, и эти два пациента также выжили. В совокупности эти отчеты подтверждают выводы авторов изобретения относительно нарсоплимаба. Впрочем, в отличие от ингибиторов C3 и C5, антитело к MASP-2 нарсоплимаб полностью сохраняет функцию классического пути комплемента и не влияет на адаптивный иммунный ответ или опосредованный комплексом антигена-антитела литический ответ (Schwaeble W. et al., Proc Natl Acad. Sci 108(18):7523-8, 2011). В клинических исследованиях нарсоплимаба не наблюдали никаких подтверждений риска инфекции, связанной с нарсоплимабом.

Хотя это было несравнительное исследование применения из соображений гуманности, две разные контрольные группы обеспечивали ретроспективное сравнение. Первая была описана в недавно опубликованной статье Gritti et al. (medRxiv 2020:2020.04.01.20048561), в которой оценивали применение силтуксимаба, ингибитора IL-6, у пациентов с COVID-19. В исследовании силтуксимаба и настоящем исследовании нарсоплимаба участвовали одни и те же ведущие исследователи (G.G. и A.R.), критерии

отбора участников и характеристики пациентов (например, демографические данные, симптомы, сопутствующие заболевания, тяжесть ОРДС, показатели лабораторных исследований и респираторная поддержка при включении в исследование). В данном исследовании уровень смертности в группе, получавшей силтуксимаб, и в контрольной группе составил 33% и 53% соответственно. Второй ретроспективный компаратор представлен 33 пациентами, которые были случайным образом отобраны в нашей больнице для оценки перспективности измерений ЦЭК у больных COVID-19. Из этих 33 пациентов 22 соответствовали тем же критериям включения и имели такие же исходные характеристики, что и пациенты, получавшие нарсоплимаб. Однако среднее исходное количество ЦЭК в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей нарсоплимаб, составляло 101/мл и 334/мл соответственно. Примечательно, что 20 из этих 22 пациентов (91%) получали ингибиторы IL-6 (тоцилизумаб или силтуксимаб) и/или стероиды, а общая 30-дневная смертность в группе составила 32%. Уровень смертности по-прежнему составлял 31%, когда анализ результатов был ограничен 16 пациентами, сопоставимыми по возрасту с пациентами, получавшими нарсоплимаб (медиана 58 лет, диапазон 51-65 лет). В этой последней группе 94% получали IL-6 и/или стероидную терапию, а медиана исходного количества ЦЭК на уровне 55/мл была в шесть раз ниже, чем у пациентов, получавших нарсоплимаб.

Применение стероидов при COVID-19 привело к сообщениям о смешанных результатах (Veronese N. et al., Front Med (Lausanne) 7:170, 2020). Совсем недавно исследование с рандомизированной оценкой терапии COVID-19 (RECOVERY) продемонстрировало, что дексаметазон снижает 28-дневную смертность у пациентов на инвазивной искусственной вентиляции легких на 28,7% (29,0% по сравнению с 40,7% при обычной терапии), на 14% (21,5%) по сравнению с 25,0% при обычной терапии) у пациентов, получавших кислородную поддержку без инвазивной искусственной вентиляции, и не влияет на смертность у пациентов, не получавших респираторную поддержку при рандомизации (17,0% в сравнении с 13,2% при обычной терапии) (Horby P. et al., medRxiv 2020:2020.06.22.20137273). На основе этих данных и опыта нашей больницы, мы считаем, что стероиды могут играть роль при лечении больных COVID-19 с респираторной дисфункцией, подавляя воспалительную реакцию. В группе, получавшей нарсоплимаб, один (пациент #1) из шести пациентов не получал стероиды. Впоследствии, в конце марта были обновлены правила больницы, требующие, чтобы все пациенты получали стероиды. Из пяти пациентов, получавших лечение нарсоплимабом и получавших стероиды, двое (пациенты #2 и #3) начали их применение после улучшения состояния, поэтому CPAP больше не требовалась или была отменена на следующий день. Как описано ранее, оценивали количество ЦЭК в отдельной группе из четырех пациентов, получавших только стероиды в течение короткого периода времени, и было обнаружено, что количество ЦЭК не зависит от введения стероидов. Это указывает на то, что любое положительное влияние стероидов на повреждение эндотелия, связанное с COVID-19, может быть отсроченным, и мало влияло на динамику выздоровления пациентов #2 и #3.

В заключение, наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что активация MASP-2 и лектинового пути, вызванная повреждением эндотелия, играет центральную роль в патофизиологии повреждения легких, связанного с COVID-19. После лечения нарсоплимабом заметно улучшение клинического состояния и результатов лабораторных исследований. Полученные данные убедительно свидетельствуют о значимой клинической эффективности и представляют подтверждающее доказательство, связанное с механизмом действия этого лекарственного средства и патофизиологией заболевания. Ингибирование лектинового пути нарсоплимабом, по-видимому, является перспективным лечением повреждения легких, связанного с COVID-19, и тромбозов, связанных с повреждением эндотелия.

Следующие дополнительные данные клинического исследования, описанного в этом Примере

Как описано выше в этом Примере, шесть пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 и ОРДС (в соответствии с Берлинскими критериями) получали нарсоплимаб (4 мг/кг внутривенно (в/в), два раза в неделю в течение 3-4 недель. Как описано в этом Примере, все шесть пациентов в этом исследовании имели дыхательную недостаточность, связанную с COVID-19. После лечения ингибитором MASP-2 нарсоплимабом все пациенты выздоровели и были выписаны из больницы. Эти пациенты находились под наблюдением с момента выписки из больницы. По состоянию на 22 октября 2020 года (через 5-6 месяцев после лечения нарсоплимабом) все шесть пациентов клинически здоровы, не имеют признаков каких-либо долгосрочных последствий, которые были зарегистрированы у пациентов с COVID-19, не получавших нарсоплимаб. Клинические лабораторные показатели для всех шести пациентов также соответствовали норме по состоянию на 22 октября 2020 года, включая уровни D-димера в сыворотке, все они оказались в границах диапазона нормальных значений (см. Таблицу 15 ниже).

В Таблице 15 показаны исходные лабораторные показатели, полученные у шести пациентов, инфицированных COVID-19, при поступлении в стационар (исходный уровень) до лечения нарсоплимабом по сравнению с лабораторными показателями, полученными в октябре 2020 года, через пять-шесть месяцев.

В Таблице 15 приведены клинические характеристики шести пациентов, получавших нарсоплимаб, в исходном состоянии (до лечения, см. также Таблицу 13) и по состоянию на октябрь 2020 года, через пять-шесть месяцев после лечения.

ТАБЛИЦА 15: Лабораторные показатели больных COVID-19, получавших нарсоплимаб

Результаты лабораторных исследований	Исходные показатели: Все пациенты до лечения нарсоплимабом (март-июнь 2020 года) (N=6)	Последняя оценка (Октябрь 2020 года) (N=6)

Количество лейкоцитов - в мм^3, медиана (диапазон) >10000 в мм^3 - количество (%) <4000 в мм^3 - количество (%)	8335 (6420-10120) 2 (33) 0 (0)	7320 (3200-8770) 0 (0) 1 (17)
Количество лимфоцитов - в мм^3, медиана (диапазон)	875 (410-1290)	2815 (810-3780)
Количество тромбоцитов $\times 10^3$ в мм^3, медиана (диапазон)	282 (199-390)	238 (170-354)
Гемоглобин - г/дл, медиана (диапазон)	13,4 (13,2-14,1)	14,8 (13,4-15,8)
Распределение других результатов исследования (лабораторные референсные диапазоны)		
С-реактивный белок (0,0-1,0 мг/дл)	14 (9,5-31,3)	0,15 (0-0,5)
Лактатдегидрогеназа (120/246 Ед/л)	518,5 (238-841)	212 (119-249)
Аспартатаминотрансфераза (13-40 Ед/л)	78,5 (51-141)	18 (12-29)
Аланинаминотрансфераза (7-40 Ед/л)	73 (37-183)	22,5 (20-67)
Креатинин (0,3-1,3 мг/дл)	0,85 (0,38-1,33)	0,94 (0,51-1,07)
D-димер (<500 нг/мл) <190 - нет (%) >190 - медиана (диапазон)		
	0 (0)	3 (50)
	1250,5 (943-1454)	324 (202-390)

Эти результаты демонстрируют, что лечение пациентов, инфицированных COVID-19, нарсоплимабом у этих шести пациентов привело к полному выздоровлению этих пациентов без подтверждений какого-либо долгосрочного осложнения.

Как широко сообщалось, многие пациенты, инфицированные COVID-19, в том числе пациенты с легкими симптомами, как и пациенты с тяжелым поражением легких, связанным с COVID-19, таким как ОРДС и/или тромбоз, страдают от непосредственных осложнений инфекции COVID-19, а также от долгосрочных последствий даже после выздоровления после первичной инфекции, их также называют "дальнобойщиками". Как описано в публикации Marshall M. ("The lasting misery of coronavirus long-haulers", Nature Vol 585, 9/17/2020, page 339-341), люди с более тяжелыми инфекциями COVID-19 могут испытывать долгосрочные нарушения работы легких, сердца, иммунной системы, головного мозга, центральной нервной системы, почек, кишечника и других, при этом даже легкие случаи инфекции COVID-19 могут вызывать длительное недомогание, подобное синдрому хронической усталости. Как также описано в публикации Marshall (2020), непосредственные и долгосрочные последствия инфекции COVID-19 включают сердечно-сосудистые осложнения (включая повреждение миокарда, кардиомиопатию, миокардит, внутрисосудистое свертывание крови, инсульт, венозные и артериальные осложнения и тромбоз легких); неврологические осложнения (в том числе когнитивные затруднения, спутанность сознания, потерю памяти, также называемую "затуманенным сознанием", головную боль, инсульт, головокружение, обмороки, судороги, анорексию, бессонницу, аносмию, агевзию, миоклонус, невропатическую боль, миалгии; развитие неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, синдром Гийена-Барре, синдром Миллера-Фишера, болезнь Паркинсона); повреждение почек (такое как острое

повреждение почек (ОПП), легочные осложнения, включая фиброз легких, одышку, легочную тромбоэмболию); воспалительные состояния, такие как синдром Кавасаки, Кавасаки-подобный синдром, мультисистемный воспалительный синдром у детей; и полиорганную недостаточность. См. также Troyer A. et al., Brain, Behavior and Immunity 87:43-39, 2020; Babapoor-Farrokhram S. et al., Life Sciences 253:117723, 2020; и Heneka M. et al., Alzheimer's Research & Therapy, vol 12:69, 2020. Как далее описано в Yelin D. et al., Lancet Infect Dis 2020, 01.09.2020, длительные жалобы людей, выздоравливающих после острого COVID-19, включают: крайнюю усталость, мышечную слабость, субфебрильную температуру, неспособность сосредоточиться, провалы в памяти, изменения настроения, проблемы со сном, покалывание в руках и ногах, диарею и рвоту, потерю вкуса и обоняния, боль в горле и трудности при глотании, первичное возникновение диабета и гипертензии, кожную сыпь, одышку, боли в груди и учащенное сердцебиение.

Как описано в этом Примере, лечение пациентов, инфицированных COVID-19, с применением нарсоплимаба у этих шести пациентов привело к полному выздоровлению этих пациентов без признаков каких-либо долгосрочных последствий инфекции COVID-19.

ПРИМЕР 22

Лечение OMS646 (нарсоплимабом) пациента #7, инфицированного COVID-19

В этом Примере описано применение нарсоплимаба (OMS646) при лечении седьмого пациента, инфицированного COVID-19 (пациента #7), с применением способов, описанных в Примере 20 и Примере 21. Результаты, описанные в этом Примере, согласуются с результатами, полученными у шести пациентов, инфицированных COVID-19, в Примере 21 и дополнительно подтверждают эффективность нарсоплимаба при лечении пациентов, инфицированных COVID-19.

Методы и результаты:

Пациент #7 - инфицированный COVID-19 76-летний мужчина с ожирением, диабетом, длительным стажем курения и ХОБЛ, который также перенес операцию по поводу рака предстательной железы (т.е. пациента классифицировали как подвергающегося "высокому риску" связанных с COVID-19 осложнений). Пациент поступил в больницу в Бергамо и первоначально нуждался в оксигенации через назальную канюлю. Его респираторный статус быстро ухудшался, и сначала потребовалась оксигенация через маску, затем искусственная вентиляция легких с постоянным положительным давлением в дыхательных путях, а затем интубация. После интубации было начато лечение нарсоплимабом (OMS646), полностью человеческим моноклональным антителом, состоящим из константных областей тяжелой цепи и легкой цепи лямбда иммуноглобулина гамма-4 (IgG4). Нарсоплимаб связывает и ингибирует MASP-2 с субнаномолярной аффинностью. Лечение пациента #7 нарсоплимабом проводили в соответствии со способами, описанными в Примере 20 и Примере 21, в дозе 4 мг/кг, вводимой внутривенно, два раза в неделю в течение 2-4 недель, с максимальным количеством от 6 до 8 доз (т.е. продолжительность введения доз две недели, три недели

или четыре недели). На данный момент пациент #7 получил 4 дозы нарсоплимаба. После лечения нарсоплимабом состояние пациента #7 быстро улучшилось, и после введения второй дозы его экстубировали. Результаты его лабораторных исследований показаны на ФИГУРЕ 52A-E, описанной ниже, введение доз обозначено вертикальными стрелками на каждом графике.

На ФИГУРЕ 52A графически проиллюстрированы значения уровня D-димера в сыворотке (нг/мл) пациента #7, больного COVID-19 в критическом состоянии, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные точки времени после лечения нарсоплимабом. Введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками. Красная горизонтальная линия представляет собой уровень нормы.

На ФИГУРЕ 52B графически проиллюстрирован уровень С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке пациента #7, больного COVID-19 в критическом состоянии, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные точки времени после лечения нарсоплимабом. Введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками. Красная горизонтальная линия представляет уровень нормы

На ФИГУРЕ 52C графически проиллюстрирован уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке (единиц/литр, Ед/л) у пациента #7, больного COVID-19 в критическом состоянии, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные точки времени после лечения нарсоплимабом. Введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками. Красная горизонтальная линия представляет собой уровень нормы.

На ФИГУРЕ 52D графически проиллюстрирован уровень аланинтрансаминазы (АЛТ) в сыворотке (единиц/литр, Ед/л) у пациента #7, больного COVID-19 в критическом состоянии, в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные точки времени после лечения нарсоплимабом. Введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками. Красная горизонтальная линия представляет собой уровень нормы.

На ФИГУРЕ 52E графически проиллюстрирован уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке пациента #7 с тяжелым COVID-19 в исходном состоянии до лечения (день 0) и в различные точки времени после лечения нарсоплимабом. Введение доз нарсоплимаба указано вертикальными стрелками. Красная горизонтальная линия представляет собой уровень нормы.

Обзор результатов:

Как показано на ФИГУРАХ 52A-52E, во время госпитализации и до начала лечения нарсоплимабом пациент #7 имел высокий уровень D-димера в сыворотке (который считается главным маркером свертываемости крови при COVID-19), высокий уровень С-реактивного белка в сыворотке (маркера воспаления), высокий уровень аспартатаминотрансферазы в сыворотке (ферментный маркер критического состояния при COVID-19), высокий уровень аланинтрансаминазы в сыворотке (маркер функции печени) и высокий уровень уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке (маркер гибели клеток). Как дополнительно показано на ФИГУРАХ 52A-52E, состояние пациента #7 улучшилось

после первой дозы нарсоплимаба, при этом все вышеуказанные лабораторные показатели снизились почти или до нормального уровня после четвертой дозы. Его экстубировали после второй дозы нарсоплимаба. Персонал ОРИТ был поражен быстрым улучшением его состояния после лечения нарсоплимабом. Быстрое улучшение состояния пациента #7, описанное в этом Примере, согласуется с выздоровлением пациентов #1-6, инфицированных COVID-19, после лечения нарсоплимабом, как описано в Примере 21.

Дополнительные данные получены из клинического исследования, описанного в этом Примере:

Как описано в этом Примере, состояние пациента #7 улучшилось после введения первой дозы нарсоплимаба, его экстубировали после введения второй дозы, и после введения четвертой дозы все вышеуказанные лабораторные показатели снизились почти до нормального уровня. В качестве обновления, пациент #7 получил в общей сложности 6 доз нарсоплимаба и был выписан из больницы. Как показано на ФИГУРЕ 53, серологические данные пациента #7 в динамике указывают, что во время лечения нарсоплимабом индуцировались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2, что указывает на то, что нарсоплимаб не препятствует эффекторной функции адаптивного иммунного ответа.

В дополнение к пациентам #1-7, описанным в настоящем документе, множество дополнительных пациентов с COVID-19, страдающих от ОРДС (всего n=19), получали лечение нарсоплимабом из соображений гуманности в соответствии со способами, описанными в Примере 20 и Примере 21, в дозе 4 мг/кг, вводимой внутривенно два раза в неделю в течение от 2 до 4 недель или 5 недель, максимумально от 4 до 10 доз (в течение двух недель, трех недель, четырех недель или 5 недель). Все дополнительные пациенты, описанные в этом примере, имели тяжелый ОРДС, связанный с COVID-19, до начала лечения, все были интубированы, при этом большинство из них начали применение нарсоплимаба через несколько дней после интубации, и у всех пациентов остальные терапии до начала лечения нарсоплимабом оказались неэффективными. Неожиданно высокие положительные результаты наблюдали у большинства пациентов, получавших нарсоплимаб, аналогичные тем, которые наблюдали у пациентов #1-7, описанных в настоящем документе. У большинства пациентов с COVID-19, получавших нарсоплимаб, наблюдали быстрое и заметное улучшение клинических симптомов и лабораторных показателей, после чего они были выписаны из больницы. Важно отметить, что больные COVID-19, получавшие нарсоплимаб, для которых доступны данные последующего наблюдения (через 5-6 месяцев после прекращения лечения нарсоплимабом), не демонстрировали наблюдаемые клинические или лабораторные признаки долгосрочных последствий. Также было замечено, что у выживших пациентов с COVID-19, получавших нарсоплимаб, вырабатывались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2, как описано выше для пациента #7. Эти результаты демонстрируют, что лечение нарсоплимабом, который специфично ингибирует лектиновый путь и оставляет альтернативный путь и классический путь комплемента полностью функциональными,

сохраняет эффекторную функцию адаптивного иммунного ответа для борьбы с инфекциями и поддерживает литический ответ, опосредованный комплексом антигена-антитела, который играет важную роль в уничтожении инфицированных вирусом клеток.

Краткое описание курса лечения критически тяжелых больных COVID-19 #8-15, получавших нарсоплимаб в Бергамо, Италии, и пациентов #1-4, получавших нарсоплимаб в США, представлено ниже:

Пациент #8 (Бергамо, Италия)

Пациент #8-76-летний мужчина с ожирением и застойной сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, дислипидемией и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 3 дня после интубации и скончался от осложнений ранее присутствовавшей кардиомиопатии после введения 3-й дозы. Его уровни D-димера и ЛДГ улучшились после 1-2 доз нарсоплимаба. Данные серологических исследований показали, что у него не выработался высокий титр антител против SARS-CoV-2.

Пациент #9 (Бергамо, Италия)

Пациент #9-41-летний мужчина с избыточным весом и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 2 дня после интубации и был экстубирован после введения второй дозы. Он получил в общей сложности 6 доз и был выписан из больницы. Его уровни D-димера и уровни ЛДГ улучшились после 1-2 доз нарсоплимаба. Данные серологических исследований показали, что в ходе лечения нарсоплимабом у него выработались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2.

Пациент #10 (Бергамо, Италия)

Пациент #10-65-летний мужчина с избыточным весом и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 3 дня после интубации и был экстубирован после 4-й дозы. Он получил в общей сложности 9 доз нарсоплимаба и был выписан из больницы. Его уровни D-димера и уровни ЛДГ улучшились после 1-2 доз нарсоплимаба. Данные серологических исследований показали, что в ходе лечения нарсоплимабом у него выработались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2.

Пациент #11 (Бергамо, Италия)

Пациент #11-68-летний мужчина с избыточным весом, артериальной гипертензией, дислипидемией и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 13 дней после интубации. Он получил в общей сложности 7 доз и скончался вследствие полиорганной недостаточности. Данные серологических исследований показали, что у него не выработался высокий титр антител против SARS-CoV-2.

Пациент #12 (Бергамо, Италия)

Пациент #12-62-летний мужчина с избыточным весом, страдающий диабетом, артериальной гипертензией, дислипидемией и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 2 дня после интубации. У него развилась нозокомиальная инфекция, потребовавшая повторной интубации с последующей трахеостомией. Он получил в общей сложности 6 доз нарсоплимаба и был выписан в реабилитационный центр. Данные серологических исследований показали, что в ходе лечения нарсоплимабом у него

выработались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2.

Пациент #13 (Бергамо, Италия)

Пациент #13-62-летний мужчина с артериальной гипертензией и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 3 дня после интубации и был экстубирован после 7 доз. Он получил в общей сложности 8 доз нарсоплимаба и дышал самостоятельно. Данные серологических исследований показали, что в ходе лечения нарсоплимабом у него выработались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2.

Пациент #14 (Бергамо, Италия)

Пациент #14 - инфицированный COVID-19 64-летний мужчина с артериальной гипертензией. Он начал лечение нарсоплимабом через 6 дней после интубации и был экстубирован после 7 доз. Он получил в общей сложности 8 доз нарсоплимаба, начал самостоятельно дышать, и был выписан в реабилитационный центр. Данные серологических исследований показали, что в ходе лечения нарсоплимабом у него выработались достаточно высокие титры антител против SARS-CoV-2.

Пациент #15 (Бергамо, Италия)

Пациент #15-79-летний мужчина с артериальной гипертензией и тяжелым COVID-19. Он начал лечение нарсоплимабом через 3 дня после интубации. Он был экстубирован после 3 доз нарсоплимаба, и его состояние продолжает улучшаться. Данные серологических исследований пока отсутствуют.

Пациент #1 (США)

Пациент #1-53-летний мужчина с тяжелой формой COVID-19, который был интубирован приблизительно в течение 2 недель после неэффективности других схем терапии, включая ремдесивир, тоцилизумаб, начальную стероидную терапию и плазму крови выздоровевших пациентов. Он начал лечение нарсоплимабом и одновременно получал эноксапарин и метилпреднизолон. Он быстро отвечал на лечение и был экстубирован вскоре после введения 5-й дозы нарсоплимаба. Его выписали в реабилитационный центр для физиотерапии, состояние улучшилось, а в прошлом месяце он вернулся к работе. Сообщали, что у него отсутствовали долгосрочные последствия COVID-19.

Пациент #2 (США)

Пациент #2-55-летняя афроамериканка с быстро ухудшающейся дыхательной функцией в результате тяжелого COVID-19. Она начала лечение нарсоплимабом через несколько дней после интубации. Ее потребность в кислороде была успешно снижена, однако из-за непереносимости маски была сделана трахеостомия для низких уровней кислородной поддержки и введен зонд для искусственного питания. Ее выписали в реанимацию, а затем домой. Трахеостомия и зонд для питания были удалены, и, как сообщалось, она хорошо себя чувствует без признаков долгосрочных клинических последствий.

Пациент #3 (США)

Пациент #3-80-летний мужчиной с тяжелым COVID-19. Он начал лечение

нарсоплимабом через несколько дней после интубации. Он скончался после 3-й или 4-й дозы нарсоплимаба. Сообщалось, что его смерть была связана с баротравмой и связанными с ней осложнениями, вызванными искусственной вентиляции легких. Его семья отказалась от проведения экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО) по религиозным соображениям.

Пациент #4 (США)

Пациент #4-61-летний мужчина с артериальной гипертензией и тяжелым COVID-19. До начала лечения нарсоплимабом его интубировали в течение 8 дней и подвергали ЭКМО. Ему не помогло лечение ремдесивиром, барицитинибом и высокими дозами стероидов. На сегодняшний день он получил несколько доз нарсоплимаба, и его клиническое состояние остается стабильным.

Вирус гриппа

Как описано в Примерах 20, 21 и 22, было продемонстрировано, что лектиновый путь способствует повреждению легких при инфекции COVID-19, и что репрезентативное MASP-2-ингибирующее антитело, нарсоплимаб, эффективно при облегчении легочных симптомов у инфицированных COVID-19 пациентов. Также было продемонстрировано, что активация комплемента способствует повреждению легких в модели инфекции, вызванной вирусом гриппа H5N1. Патогистологические изменения в легких у пациентов с инфекцией H5N1 и инфекцией SARS-CoV очень схожи. В мышиной модели H5N1 экспрессия РНК MASP-2, РНК рецептора C3a и РНК рецептора C5a была повышена в первый день после заражения. Ингибирование комплемента при применении антагониста C3aR или фактора яда кобры ослабляли повреждение легких и клинические признаки. Выживаемость также возрастала (см. Sun et al., Am J Respir Cell Mol Biol 49(2):221-30, 2013). Соответственно, ожидается, что MASP-2-ингибирующее средство также будет эффективным для применения в способах лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома или других проявлений заболевания у субъекта-млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа.

В соответствии с вышеизложенным, в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома или другого проявления заболевания, такого как тромбоз, у субъекта-млекопитающего, инфицированного коронавирусом или вирусом гриппа, включающий введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента (т.е. ингибирования активации лектинового пути). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от одного или более респираторных симптомов и/или тромбоза, и способ включает введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для уменьшения по меньшей мере одного респираторного симптома (т.е. улучшения дыхательной функции) и/или уменьшения тромбоз.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному COVID-19. В одном варианте осуществления способ включает

введение композиции субъекту, инфицированному SARS-CoV. В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному MERS-CoV. В одном варианте осуществления у субъекта выявлен коронавирус (т.е. COVID-19, SARS-CoV или MERS-CoV) до введения MASP-2-ингибирующего средства. В одном варианте осуществления субъект идентифицирован как инфицированный COVID-19 и нуждающийся в кислородной поддержке, и MASP-2-ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело, такое как, например, нарсоплимаб, вводят субъекту в дозе и в течение периода времени, которые эффективны для устранения потребности в кислородной поддержке.

В одном варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий COVID-19 и страдающий или подвергающийся риску развития тромбоза, вызванного COVID-19, и способ включает введение композиции, содержащей MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело, такое как нарсоплимаб) в терапевтически эффективном количестве для лечения, предотвращения или уменьшения тяжести коагуляции или тромбоза у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению обеспечивают антикоагуляцию, и/или антитромбоз, и/или антитромбогенез, не влияя на гемостаз. В одном варианте осуществления уровень D-димера измеряют у субъекта, страдающего COVID-19, для определения присутствия или отсутствия тромбоза у указанного субъекта, где уровень D-димера выше стандартного диапазона указывает на присутствие тромбоза, и субъекта лечат MASP-2-ингибирующим средством (например, MASP-2-ингибирующим антителом, таким как нарсоплимаб) в терапевтически эффективном количестве для лечения, предотвращения или снижения тяжести коагуляции или тромбоза у указанного субъекта, которое можно измерять, например, по снижению уровня D-димера до диапазона нормальных значений у здорового субъекта.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному вирусом гриппа, таким как вирус гриппа A (H1N1 (вызвавший пандемии "испанского гриппа" в 1918 году и "свиного гриппа" в 2009 году), H2N2 (вызвавший пандемию "азиатского гриппа" в 1957 году), H3N2 (вызвавший пандемию "гонконгского гриппа" в 1968 году), H5N1 (вызвавший пандемию "птичьего гриппа" в 2004 году), H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9 и H6N1) или вирус гриппа типа B, или вирус гриппа типа C. В одном варианте осуществления у субъекта выявлен вирус гриппа до введения MASP-2-ингибирующего средства.

В одном варианте осуществления у субъекта обнаружен повышенный уровень циркулирующих эндотелиальных клеток в образце крови, полученном у субъекта до лечения MASP-2-ингибирующим средством, по сравнению с уровнем циркулирующих эндотелиальных клеток у контрольного здорового субъекта или группы субъектов. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2-ингибирующего средства в количестве, достаточном для снижения количества циркулирующих эндотелиальных клеток у субъекта, инфицированного коронавирусом или вирусом

гриппа.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство представляет собой малую молекулу, которая ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором экспрессии MASP-2.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело по существу не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческоц сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, композицию, включающую MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (т.е. 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг /кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг), по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение по меньшей мере 2 недель (например, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель, или по меньшей мере 9 недель, или по меньшей мере 10 недель, или по меньшей мере 11 недель, или по меньшей мере 12 недель).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела составляет приблизительно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 мг/кг до 4,4 мг/кг).

В одном варианте осуществления дозу MASP-2-ингибирующего антитела

(например, нарсоплимаба) вводят субъекту, страдающему COVID-19, в дозе приблизительно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 мг/кг до 4,4 мг/кг), по меньшей мере два раза в неделю в течение периода времени продолжительностью по меньшей мере две недели или по меньшей мере три недели, или по меньшей мере четыре недели (например, от двух недель до четырех недель).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу от приблизительно 300 мг до приблизительно 450 мг (т.е. от приблизительно 300 мг до приблизительно 400 мг или от приблизительно 350 мг до приблизительно 400 мг), такую как приблизительно 300 мг, приблизительно 305 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 315 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 335 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 345 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 355 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 365 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 385 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 395 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 405 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 415 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 435 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 445 мг или приблизительно 450 мг. В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу приблизительно 370 мг (±10%).

В одном варианте осуществления способ включает введение фиксированной дозы MASP-2-ингибирующего антитела приблизительно 370 мг (±10%) субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, два раза в неделю внутривенно, в течение периода лечения продолжительностью по меньшей мере 8 недель.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство доставляют субъекту системно. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство вводят перорально, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутриартериально, внутривенно или в виде ингаляционного средства.

В одном варианте осуществления субъект страдает вызванной COVID-19 пневмонией или ОРДС, и MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят в течение времени, достаточного для облегчения одного или более симптомов пневмонии или ОРДС. В одном варианте осуществления субъект находится на искусственной вентиляции легких, и MASP-2-ингибирующее средство (например, ингибирующее антитело MASP-2) вводят в дозе и в течение периода времени, достаточных для прекращения потребности в искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления субъект находится на аппарате инвазивной искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления субъект находится на аппарате неинвазивной искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят в дозе и в течение периода времени, достаточных для прекращения применения

кислородной поддержки.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, в комбинации с одним или больше дополнительными терапевтическими средствами, как в фармацевтической композиции, включающей MASP-2-ингибирующее средство и одно или больше противовирусных средств, или один или больше антикоагулянтов, или одно или больше терапевтических антител, или одно или больше терапевтических низкомолекулярных соединений. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, где субъект подвергается лечению одним или больше дополнительными терапевтическими средствами, такими как одно или больше противовирусных средств или один или больше антикоагулянтов, или одно или больше терапевтических антител, или одно или больше терапевтических низкомолекулярных соединений.

В соответствии с вышеизложенным, в еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, облегчения, предотвращения или снижения риска развития одного или больше долгосрочных последствий у субъекта-млекопитающего, инфицированного коронавирусом или вирусом гриппа, включающий введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента (т.е. ингибирования активации лектинового пути). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от одного или больше респираторных симптомов и/или тромбоза, и способ включает введение субъекту количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для уменьшения по меньшей мере одного респираторного симптома (т.е. улучшения дыхательной функции) и/или уменьшения тромбоза.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному COVID-19. В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному SARS-CoV. В одном варианте осуществления способ включает введение композиции субъекту, инфицированному MERS-CoV. В одном варианте осуществления у субъекта выявлен коронавирус (т.е. COVID-19, SARS-CoV или MERS-CoV) до введения MASP-2-ингибирующего средства. В одном варианте осуществления субъект идентифицирован как инфицированный COVID-19 и нуждающийся в кислородной поддержке, и MASP-2-ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело, такое как, например, нарсоплимаб, вводят субъекту в дозе и в течение периода времени, эффективных для устранения потребности в кислородной поддержке.

В одном варианте осуществления субъект идентифицирован как инфицированный

COVID-19 и испытывает легкие симптомы, и MASP-2-ингибирующее средство, такое как MASP-2-ингибирующее антитело, такое как, например, нарсоплимаб, вводят субъекту в дозе и в течение периода времени, эффективных для лечения, облегчения, предотвращения или снижения риска развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ может применяться для лечения, улучшения состояния, предотвращения или снижения риска развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, у субъекта, страдающего или ранее инфицированного COVID-19, где долгосрочные последствия выбраны из группы, состоящей из сердечно-сосудистых осложнений (включая повреждение миокарда, кардиомиопатию, миокардит, внутрисосудистое свертывание крови, инсульт, венозные и артериальные осложнения и легочный тромбоз); неврологических осложнений (включая когнитивные затруднения, спутанность сознания, потерю памяти, также называемые "затуманенным сознанием", головную боль, инсульт, головокружение, обмороки, судороги, анорексию, бессонницу, аносмию, агевзию, миоклонус, нейропатическую боль, миалгии; развития неврологических заболеваний, таких как как болезнь Альцгеймера, синдром Гийена-Барре, синдром Миллера-Фишера, болезнь Паркинсона); повреждения почек (например, острой почечной недостаточности (ОПП); легочных осложнений, включая фиброз легких, одышку, легочную тромбоэмболию) и воспалительных состояний, таких как синдром Кавасаки, Кавасаки-подобный синдром, мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C) и полиорганная недостаточность у субъекта, инфицированного COVID-19. Недавно опубликованные данные показывают, что инфекция SARS-CoV-2 у детей приводит к высокой заболеваемости ТМА, независимо от клинической тяжести (см. Diorio C. et al., Blood Advances vol 4(23), Dec 8, 2020). Также сообщали, что инфекция SARS-CoV-2 у детей может привести к мультисистемному воспалительному синдрому (MIS-C) (см. Radia T. et al., Paediatr Respri Rev Aug 11, 2020).

Несколько международных групп недавно опубликовали сообщения, согласно которым более 60% "выздоровевших" пациентов после COVID-19 имеют серьезные последствия, включая когнитивные/ЦНС, легочные, сердечные, печеночные и другие отклонения (см., например, Bonow et al., JAMA Cardiology vol 5(7) July 2020; Del Rio et al., JAMA vol 324 (17), November 2020; Lindner et al., JAMA Cardiology vol 5(11), November 2020; Marchiano S. et al., bioRxiv, August 30, 2020; Puntmann V. et al., JAMA Cardiology vol 5 (11), November 2020; Xiong Q. et al., Clin Microbial Infect 2020). Например, как описано в публикации Yelin D. et al., Lancet Infect Dis 2020, 9/1/2020, длительные жалобы лиц, выздоравливающих после острого COVID-19, включают: крайнюю усталость, мышечную слабость, субфебрилитет, неспособность к концентрации внимания, провалы в памяти, изменения настроения, нарушения сна, покалывания в руках и ногах, понос и рвоту, потерю вкуса и обоняния, боль в горле и затрудненное глотание, первичное возникновение диабета и гипертензии, кожную сыпь, одышку, боли в груди и учащенное сердцебиение. Примечательно то, что, как описано в Примерах 21 и 22 в настоящем

документе, в ходе 5-6-месячного последующего наблюдения за первыми 6 пациентами с COVID-19 в Бергамо, прошедшими лечение нарсоплимабом, не было обнаружено клинических или лабораторных подтверждений долгосрочных последствий COVID-19.

В одном варианте осуществления у субъекта определен повышенный уровень циркулирующих эндотелиальных клеток в образце крови, полученном от субъекта до лечения MASP-2-ингибирующим средством, по сравнению с уровнем циркулирующих эндотелиальных клеток у контрольного здорового субъекта или группы субъектов. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение MASP-2-ингибирующего средства в количестве, достаточном для снижения количества циркулирующих эндотелиальных клеток у субъекта, инфицированного коронавирусом или вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство представляет собой малую молекулу, которая ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором экспрессии MASP-2.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело по существу не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с IC_{50} 30 нМ или меньше.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, композиции, включающей MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO:69, в дозе от 1

мг/кг до 10 мг/кг (т.е. 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг /кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг), по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение по меньшей мере 2 недель (например, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель, или по меньшей мере 9 недель, или по меньшей мере 10 недель, или по меньшей мере 11 недель, или по меньшей мере 12 недель).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела составляет приблизительно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 мг/кг до 4,4 мг/кг).

В одном варианте осуществления дозу MASP-2-ингибирующего антитела (например, нарсоплимаба) вводят субъекту, страдающему COVID-19, в дозе приблизительно 4 мг/кг (т.е. от 3,6 мг/кг до 4,4 мг/кг), по меньшей мере два раза в неделю в течение периода времени по меньшей мере две недели или по меньшей мере три недели, или по меньшей мере четыре недели, или по меньшей мере пять недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель (например, от двух недель до четырех недель или от двух недель до пяти недель, или от двух недель до шести недель, или от двух недель до семи недель, или от двух недель до восьми недель).

В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу от приблизительно 300 мг до приблизительно 450 мг (т.е. от приблизительно 300 мг до приблизительно 400 мг или от приблизительно 350 мг до приблизительно 400 мг), например, приблизительно 300 мг, приблизительно 305 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 315 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 335 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 345 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 355 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 365 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 385 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 395 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 405 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 415 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 435 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 445 мг или приблизительно 450 мг. В одном варианте осуществления доза MASP-2-ингибирующего антитела представляет собой фиксированную дозу приблизительно 370 мг (±10%).

В одном варианте осуществления способ включает введение фиксированной дозы MASP-2-ингибирующего антитела приблизительно 370 мг (±10%) субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, два раза в неделю внутривенно, в течение периода лечения продолжительностью по меньшей мере 8 недель.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство доставляют субъекту системно. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство вводят перорально, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутриартериально,

внутривенно или в виде ингаляционного средства.

В одном варианте осуществления субъект страдает пневмонией или ОРДС, вызванными COVID-19, и MASP-2-ингибирующее средство (например, ингибирующее антитело MASP-2) вводят в течение времени, достаточного для облегчения одного или больше симптомов пневмонии или ОРДС, и для облегчения или предотвращения долгосрочных последствий, связанных с COVID-19. В одном варианте осуществления субъект находится на аппарате искусственной вентиляции легких, и MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят в дозе и в течение периода времени, достаточных для прекращения потребности в искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления субъект находится на аппарате инвазивной искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления субъект находится на аппарате неинвазивной искусственной вентиляции легких. В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят в дозе и в течение периода времени, достаточных для прекращения применения кислородной поддержки.

В одном варианте осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, в комбинации с одним или больше дополнительными терапевтическими средствами, как в фармацевтической композиции, включающей MASP-2-ингибирующее средство и одно или больше противовирусных средств, или один или больше антикоагулянтов, или одно или больше терапевтических антител, или одно или больше терапевтических низкомолекулярных соединений. В некоторых вариантах осуществления MASP-2-ингибирующее средство (например, MASP-2-ингибирующее антитело) вводят субъекту, инфицированному коронавирусом или вирусом гриппа, где субъект подвергается лечению одним или больше дополнительными терапевтическими средствами, такими как одно или больше противовирусных средств или один или больше антикоагулянтов, или одно или больше терапевтических антител, или одно или больше терапевтических низкомолекулярных соединений.

ПРИМЕР 23

Нуклеокапсидный белок (N) SARS-Cov-2 связывается с MASP-2 и активирует комплемент C4, и репрезентативное MASP-2-ингибирующее антитело HG4 ингибирует такую активацию.

Теоретические основы/обоснование:

Как описано в Примерах 21 и 22, лечение больных COVID-19, страдающих от ОРДС, с применением MASP-2-ингибирующего антитела, нарсоплимаба, привело к быстрым улучшениям. В данном Примере продемонстрировано, что нуклеокапсидный белок (N) SARS-Cov-2 связывается с MASP-2 и активирует C4 комплемента, а

репрезентативное антитело HG4, ингибирующее MASP-2, ингибирует эту активацию, что еще раз подтверждает, что MASP-2-опосредованный лектиновый путь активируется после инфицирования SARS-Cov-2.

1. Нуклеокапсидный белок SARS-Cov-2 связывается с MASP-2.

Методы:

Микротитрационные планшеты покрывали 1 мкг/лунка рекомбинантным нуклеокапсидным белком SARS-Cov-2 (NP2) или контрольным субстратом (BSA). Остаточные сайты связывания блокировали при использовании 1% BSA. Добавляли серийные разведения рекомбинантного MASP-2 (rMASP-2) и детектировали связывание при использовании мАт против MASP-2.

Результаты:

На ФИГУРЕ 54 графически проиллюстрировано зависимое от концентрации связывание рекомбинантного MASP-2 с нуклеокапсидным белком SARS-Cov-2 (NP2) в сравнении с контролем BSA.

2. MASP-2 связывается напрямую с N-белком SARS-Cov-2 и опосредует активацию комплемента C4.

Методы:

Микротитрационные планшеты покрывали 2,5 мкг/лунка рекомбинантного нуклеокапсидного белка SARS-Cov-2 (NP2). Остаточные сайты связывания блокировали при использовании 1% BSA. Добавляли rMASP-2 (1 мкг) в забуференном барбиталом растворе хлорида натрия (BBS). В контрольные лунки добавляли только буфер. После 1 часа инкубирования при 37°C лунки промывали TBS/Tween. В каждую лунку добавляли очищенный человеческий C4 (1 мкг). Ингибирующее антитело к MASP-2, HG4 (0,1 мкМ) (также называемое OMS646-SGMI-2, как описано в Примере 13), добавляли в некоторые лунки, покрытые NP2, содержащие rMASP-2 и C4. После 1 часа инкубирования при 37°C супернатант аспирировали, разделяли в ДСН-ПААГ геле в восстанавливающих условиях и наносили на Вестерн-блот следующим образом:

Дорожка 1: контроль только с C4

Дорожка 2: NP2 плюс rMASP-2 плюс C4:

Дорожка 3: NP2 плюс rMASP-2 плюс C4 плюс HG4 (0,1 мМ)

Дорожка 4: NP2 плюс C4

Дорожка 5: BSA плюс rMASP-2 плюс C4

Результаты:

На ФИГУРЕ 55 показаны результаты Вестерн-блоттинга в геле ДСН-ПААГ, где: Дорожка 1 содержит очищенный C4 в качестве контроля, показывая полосы, соответствующие C4α, C4β и C4γ. Дорожка 2 содержит NP2 плюс rMASP-2 плюс C4, показывая C4α, C4β, C4γ и новую полосу, соответствующую C4'α, что указывает на то, что MASP-2 напрямую связывается с NP2 и расщепляет C4. Дорожка 3 содержит NP2 плюс rMASP-2 плюс C4 плюс HG4 (0,1 мкМ), показывая, что добавление MASP-2-ингибирующего антитела HG4 ингибировало NP2/MASP-2-опосредованное расщепление

C4. Дорожка 4 содержит NP2 плюс C4, показывая отсутствие расщепления C4 в отсутствие MASP-2. Дорожка 5 содержит BSA плюс MASP-2 плюс C4, показывая отсутствие расщепления C4 в отсутствие NP2.

Обсуждение

Данный Пример демонстрирует, что нуклеокапсидный белок SARS-Cov-2 (NP2) связывается с MASP-2 и активирует C4 комплемента, а репрезентативное антитело HG4, ингибирующее MASP-2, ингибирует эту активацию, что еще раз подтверждает, что MASP-2-опосредованный лектиновый путь активируется после инфицирования SARS-Cov-2.

ПРИМЕР 24

Продольное исследование для измерения активации комплемента у пациентов с острым COVID-19 в сравнении со здоровыми добровольцами

Теоретические основы/обоснование:

Инфицирование новым штаммом коронавируса SARS-CoV-2 обычно проходит бессимптомно или с легкими обострениями заболевания. Тем не менее, у небольшой части инфицированных SARS-CoV-2 может вызывать тяжелое или угрожающее жизни заболевание с легкой или тяжелой длительной патологией и смертностью. От чего зависит предрасположенность к тяжелым обострениям, до конца не выяснено, и, помимо сопутствующих патологий, считается, что на риск развития тяжелой и фатальной патологии могут влиять генетические факторы, эпигенетические явления, а также возрастные и половые различия. Экспериментальные данные, представленные в настоящем документе и опубликованные в статье Rambaldi A. et al., Immunobiology 225(6):152001, 2020, и в других источниках, четко показывают, что система комплемента является ключевым движущим фактором воспалительной реакции как при инициации, так и сохранении эндотелиальной патологии при остром COVID-19. Как описано выше в Примерах 21 и 22, а также в публикации Rambaldi A. et al., Immunobiology 225(6):152001, 2020, лечение тяжелобольных пациентов с COVID-19 нарсоплимабом, ингибирующим антителом против MASP-2, привело к терапевтическому прорыву с быстрым уменьшением проявлений болезни после инфузий. Как дополнительно описано в Примере 23, в соответствии с терапевтической эффективностью нарсоплимаба было продемонстрировано, что нуклеокапсидный белок SARS-Cov-2 (NP2) связывается напрямую с MASP-2, приводя к расщеплению C4, которое блокируется антителом к MASP-2, HG4.

В этом Примере проводили дальнейшее исследование каждого из трех путей активации комплемента у доноров на определенных стадиях и при определенной тяжести COVID-19, чтобы определить клинические и прогностические маркеры острого COVID-19 с целью определения окна терапевтических возможностей для лечения, а также дальнейшего понимания молекулярных событий, которые вызывают острый COVID-19. Результаты также могут обеспечивать прогностические клинические маркеры тяжести заболевания и продолжающихся провоспалительных событий, ведущих к

неблагоприятным исходам синдрома долгого COVID-19.

Методы:

В этом примере описаны первоначальные результаты продолжающегося исследования по измерению активации комплемента у различных категорий субъектов, в котором у различных категорий доноров для получения лонгитудинальных данных забирали образцы плазмы и сыворотки крови следующим образом:

Категории:

(1) доноры с острым или пост-острым COVID-19 (также называемым долгим COVID-19),

Пациенты с острым состоянием: образцы пациентов с COVID-19, взятые в течение 15 дней после госпитализации (0-4 дня, 5-10 дней и 11-15 дней).

Выздоровевшие/выздоравливающие пациенты: субъекты через 3 месяца после выздоровления от острого COVID-19 (т.е. пациенты, перенесшие острый COVID-19 и выписанные из больницы).

(2) доноры с положительным результатом теста на SARS-CoV-2 и либо бессимптомные, либо с легкими симптомами, не требующими госпитализации.

(3) неинфицированные медицинские работники (MP) (т.е. серонегативные на SARS-CoV-2)

Анализы комплемента (CH50, C5a, Bb)

Активация комплемента приводит к высвобождению провоспалительного анафилатоксина C5a, вместе с фактором Bb, маркером активации альтернативного пути, которые измеряли в различных категориях субъектов, как описано ниже.

Анализ CH50

Анализ CH50 измеряет общий гемолиз комплемента овечьих эритроцитов, покрытых антителом против овечьих эритроцитов.

На ФИГУРЕ 56 графически проиллюстрированы значения CH50 в образцах, полученных у различных категорий субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике представляет отдельного субъекта.

Как показано на **ФИГУРЕ 56**, общий гемолиз комплемента нарушается из-за расходования комплемента на ранних стадиях инфекции SARS-CoV-2, о чем свидетельствуют очень низкие значения CH50 у пациентов с острым COVID-19 в дни 0-4 после госпитализации; через 5-10 дней после госпитализации; и через 11-15 дней после госпитализации по сравнению со значениями CH50 у выздоравливающих пациентов (через 2-3 месяца после выписки из стационара); SARS-Cov-2 положительный персонал; и серонегативный персонал (т.е. отрицательный на SARS-Cov-2). Как дополнительно показано на **ФИГУРЕ 56**, у большинства выздоравливающих пациентов наблюдается повышение значений CH50 до диапазона нормальных значений.

Анализ C5a

Анализ C5a измеряет провоспалительный продукт активации комплемента C5a, общий для всех трех путей комплемента. Анализ представляет собой коммерчески

доступный сэндвич-ИФА от R&D systems (номер по кат. DY2037).

На **ФИГУРЕ 57** графически проиллюстрирован уровень C5a (нг/мл) в образцах плазмы, полученных у различных категорий субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике представляет отдельного субъекта.

Как показано на ФИГУРЕ 57, уровни C5a в плазме крови, полученные у пациентов с острым COVID-19, в дни 0-4 дня после госпитализации (n=16); через 5-10 дней после госпитализации (n=12) и через 11-15 дней (n=12) после госпитализации значимо превышают уровни C5a в плазме, полученной у выздоравливающих пациентов (n=36), серопозитивного персонала (n=30) и серонегативного персонала (n=26).

Анализ Bb

Состояние активации альтернативного пути (АП) определяли при использовании коммерческого сэндвич-ИФА, который позволяет обнаруживать неоэпитоп Bb, продукта активации АП (Quidel MicroVue Bb Plus EIA).

На ФИГУРЕ 58 графически проиллюстрирован уровень Bb (мкг/мл) в плазме, полученный у различных категорий субъектов в продольном исследовании, где каждый символ "x" на графике представляет отдельного субъекта.

Как показано на ФИГУРЕ 58, уровни Bb в плазме крови, полученной у пациентов с острым COVID-19, в дни 0-4 после госпитализации; через 5-10 дней после госпитализации и через 11-15 дней после госпитализации значимо превышают уровни Bb в плазме, полученной у выздоравливающих пациентов, серопозитивного и серонегативного персонала. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 58, уровень Bb у выздоровевших пациентов находится в пределах диапазона нормальных значений в контрольной группе здоровых субъектов (серонегативный персонал).

Результаты:

Как показано на ФИГУРАХ 56, 57 и 58, активация комплемента происходит на ранних стадиях у субъектов, страдающих острым COVID-19, что подтверждается низким уровнем CH50 (ФИГ. 56), высоким уровнем C5a (ФИГ. 57) и высоким уровнем Bb (ФИГ. 58) у пациентов с острыми заболеванием в течение 15 дней после госпитализации по сравнению с выздоравливающими пациентами и здоровым контролем. Кроме того, было показано, что АП активируется на ранней стадии инфекции, что подтверждается высокими уровнями Bb у пациентов с острым заболеванием в течение 15 дней после госпитализации, которые возвращаются к нормальным значениям после выздоровления (см. ФИГУРУ 58).

ПРИМЕР 25

Высокие уровни комплекса C1-INH/MASP-2 коррелируют с острым COVID-19

Теоретические основы/обоснование:

SARS-Cov2 - это недавно появившийся вирус с очень высокой инфекционностью и риском смерти у лиц с тяжелым эндотелиальным заболеванием и респираторными симптомами. Для получения максимального успеха при защите людей от этого заболевания, существует острая необходимость в биомаркерах и высокоточных тестах для

выявления лиц, подверженных риску развития острого и/или долгосрочного заболевания (пост-острого COVID-19, также известного как синдром долгого COVID-19), или у которых развился защитный иммунный ответ против болезни COVID-19. Также существует необходимость в тестах для определения эффективности терапевтических средств для лечения и/или предотвращения связанных с COVID-19 осложнений, в том числе у тех, кто страдает долгим COVID-19 или подвергается риску его развития.

Как описано в Примере 24, активация комплемента происходит на ранней стадии у субъектов, страдающих острым COVID-19, что подтверждается низкими уровнями CH50 (ФИГ. 56), высокими уровнями C5a (ФИГ. 57) и высокие уровнями Bb (ФИГ. 58) у пациентов с острым зоболеванием в течение 14 дней после госпитализации по сравнению со здоровыми субъектами в контрольной группе. Кроме того, было продемонстрировано, что альтернативный путь (АП) активируется на ранней стадии инфекции, что подтверждается высокими уровнями Bb у пациентов с острым COVID-19 в течение 15 дней после госпитализации, и которые возвращаются к нормальным значениям после выздоровления (см. ФИГУРУ 58).

В этом Примере описана разработка чувствительного анализа сэндвич-ИФА, который позволяет определять количество комплекса MASP-2/C1-INH в образцах человеческой сыворотки. В этом примере также описано применение этого чувствительного анализа сэндвич-ИФА для изучения состояния активации лектинового пути (ЛП) в различных группах субъектов (т.е. перенесших острый COVID-19 выздоравливающих пациентов и здоровых контрольных субъектов) путем измерения уровня комплекса MASP-2/CI-INH в жидкой фазе в образцах сыворотки, полученных у таких субъектов.

Методы:

1. ИФА анализ комплекса MASP-2/C1-INH

MASP-2 присутствует в плазме крови в виде зимогена, связанного с одной из нескольких молекул распознавания паттернов лектинового пути (ЛП). Форма зимогена свободно связана с ингибитором сериновой протеазы, C1-INH. Когда достаточное количество распознающих молекул ЛП связывается в непосредственной близости с активирующей поверхностью, зимоген MASP-2 расщепляется на две цепи, связанные дисульфидными связями, либо другой молекулой MASP-2, либо MASP-1. Расщепленный MASP-2 представляет собой активную форму фермента, который расщепляет свои субстраты, нижестоящие компоненты комплемента C4 и C2. Активность MASP-2 регулируется C1-INH, который сильно связывается с активированным MASP-2, образуя стабильный комплекс в соотношении 1:1.

Для определения состояния активации эффекторного фермента ЛП, MASP-2, использовали такую особенность ингибитора C1 (C1-INH), преимущество которого состоит в том, что он действует как псевдосубстрат после активации MASP-2 и образует ковалентный жидкофазный комплекс MASP-2/C1-INH. Таким образом, уровень комплекса MASP-2/C1-INH в образце плазмы или сыворотки обеспечивает четкий количественный

показатель недавней активации ЛП.

Белок MASP-2 человека (зрелая форма) представлен как SEQ ID NO:6.

Ингибитор С1-эстеразы человека (C1-INH), Genbank CAA38358, представлен ниже как SEQ ID NO:86 (ак 1-21 сигнальный пептид, ак 22-500 зрелый белок)

MASRLTLLTLLLLLLAGDRASSNPNATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLF
VEPILEVSSLPTTNSTTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPT
TGSFCPGPVTLCSDLESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLL
TQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVN
ASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLSAK
WKTTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLV
ILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKL
EFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVLELTETGVEAAAASAISVARTLLVFEVQQ
PFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPRA

В работе Kajdacsi et al., Front Immunol vol 11, 2020, моноклональное крысиное IgG1 антитело против MASP-2 человека производства Hycult Biotech (мАт 8B5) использовали в качестве захватывающего антитела для измерения комплексов MASP-2/C1-INH у здоровых людей и пациентов с наследственным ангионевротическим отеком (НАО) при 10% концентрациях сыворотки. В работе Hansen et al., J of Immunol 195:3596-3604, 2015, также использовали моноклональное крысиное IgG1 антитело против MASP-2 человека производства Hycult Biotech (мАт 8B5) в анализе ИФА для измерения комплексов MASP-2/C1-INH у пациентов с НАО. Хансен с соавт. наблюдала, что комплексы MASP-2/C1-INH обнаруживались только при очень высоких концентрациях в сыворотке человека (20% или выше) по сравнению с комплексами MASP-1/C1-INH, и предположила, что это может быть связано с гораздо более низкой концентрацией MASP-2 в человеческой сыворотке по сравнению с MASP-1 или с тем, что коммерческое мАт к MASP-2 8B5 в меньшей степени применимо в качестве антитела в таком анализе по сравнению с мАт против MASP-1, использованным в их исследовании (см. Hansen et al. на стр. 3602-3603, связующий абзац).

Для разработки чувствительного анализа ИФА, подходящего для скрининга образцов отдельных пациентов при концентрациях сыворотки меньше 10% (т.е. от 0,3% до 8% сыворотки, например, от 0,3% до 7% сыворотки, например, от 0,3% до 6% сыворотки, например, от 0,3% до 5% сыворотки), на присутствие и/или количество комплекса MASP-2/C1-INH, панели моноклональных антител, которые, как известно, связываются с MASP-2 (клоны C1, C7, D8 и H1) тестировали в качестве захватывающих антител. Эти мАт (клоны C1, C7, D8 и H1) продуцировались из гибридом, полученных у иммунизированных MASP-2 нокаутных мышей, и при этом было обнаружено, что они связываются с MASP-2, но не ингибировали функциональную активность MASP-2 (данные не показаны).

МАт против MASP-2: C1, C7, D8, H1 тестировали в качестве кандидатных захватывающих антител в формате анализа ИФА для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH следующим образом.

(i). Микротитрационные планшеты Nunc Maxisorb покрывали 100 мкл клонов кандидатных захватывающих антител против MASP-2 #C1, #C7, #D8 и #H1 (2 мкг/мл) в карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Микротитрационный планшет блокировали 280 мкл/лунка 1% (в/об) BSA в буфере TBS в течение 1 ч при КТ.

(ii) Активированную контрольную сыворотку подготавливали путем разбавления смешанной нормальной человеческой сыворотки (НЧС) до 20% об/об в Tris-буферизированном солевом растворе (TBS; 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) с 5 мМ Ca^{2+}. Маннан-агарозу (100 мкл, кат. Sigma M9917) два раза промывали пятью объемами TBS/Ca^{2+} и ресуспендировали до 100 мкл в том же буфере. По 500 мкл 20% сыворотки добавляли к 100 мкл маннан-агарозы и инкубировали при комнатной температуре (КТ) при легком встряхивании или вращении в течение 30 минут. Затем добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ и инкубировали еще 2 минуты. Затем агарозу центрифугировали, активированную сыворотку аспирировали и хранили при -20°C.

(iii) Серийные разведения приготавливали из активированной контрольной сыворотки в диапазоне от 0,1% до 20% и в TBS/Ca^{2+}. Блокирующий буфер удаляли и добавляли в планшет 100 мкл/лунка образцов или контрольной сыворотки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты три раза промывали 280 мкл TBS/Ca^{2+}/0,05% Tween 20 (промывочным буфером).

(iv) Добавляли 100 мкл/лунка детектирующего Ат против C1-INH (аффинно-очищенного кроличьего поликлонального антитела против C1-INH, кат. Proteintech 12259-1-AP, разведенного 1:2000 в TBS/Ca^{2+}) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

(v) Затем планшет 3 раза промывали, как описано выше. Добавляли 100 мкл/лунка HRP-конъюгата против иммуноглобулина кролика (Sigma, 1:5000) и инкубировали еще 45 мин.

(vi) Затем планшет 3 раза промывали, как описано выше, и добавляли 100 мкл/лунка субстрата TMB. При появлении синего окрашивания добавляли 50 мкл/лунка 2H H_2SO_4 для остановки реакции и измеряли $OD_{450\ нм}$.

Результаты:

На ФИГУРЕ 59 графически проиллюстрировано количество детектированного комплекса MASP-2/C1-INH на основе значений OD_{450} с каждым из четырех кандидатных мАт против MASP-2 (клоны C1, C7, D8 и H1) при различных концентрациях активированной сыворотки. Следует отметить, что количество комплекса MASP-2/C1-INH в нормальной, неактивированной сыворотке будет соответствовать исходному уровню (данные не показаны).

Как показано на ФИГУРЕ 59, мАт #C7 намного превосходит другие протестированные антитела против MASP-2 для применения в качестве захватывающих антител к MASP-2/C1-INH в анализе ИФА. Как показано на ФИГУРЕ 59, мАт #7 может обнаруживать комплекс MASP-2/CI-INH в диапазоне разведения ниже 5% (т.е. от 0,3% до

5%) в активированной человеческой сыворотке. Следует отметить, что коммерческие антитела производства Hycult (клон 8B5 и клон 6G12) также были протестированы в качестве кандидатных антител для захвата в этом формате анализа, и полученные результаты были аналогичны результатам мАт C1 и D8 (т.е. они не подходили для применения в чувствительном анализе ИФА). МАт #C7 было выбрано для применения в высокочувствительном анализе ИФА и описано ниже.

мАт против MASP-2 #C7: (CDR-области на основе системы нумерации Кэбата подчеркнуты)

Вариабельная область тяжелой цепи: (SEQ ID NO:87)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYLMSWVRQTPEKRLEWVATISGG GGNTYHPDSMKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTALYYCARHGDFGNYFDYWGQ GTTLTVSS

Вариабельная область легкой цепи: (SEQ ID NO:88)

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGTQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLFTFGAGTKLELKR

CDR-области мАт против MASP-2 #C7:

HC-CDR1 (SEQ ID NO:89): SYLMS

HC-CDR2 (SEQ ID NO:90): TISGGGGNTYHPDSMKG

HC-CDR3 (SEQ ID NO:91): HGDFGNYFDY

LC-CDR1 (SEQ ID NO:92): KSSQSLLNSGTQKNYLA

LC-CDR2 (SEQ ID NO:93): WASTRES

LC-CDR3 (SEQ ID NO:94): KQSYNLFT

VH_#C7 (SEQ ID NO:95)

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCC CTAAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTTTCAGTAGTTATCTTATGTCTTGGG TTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGGTGGTGGT GGTAACACTTACCATCCAGACAGTATGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAA TGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCT TGTATTACTGTGCAAGACATGGGGACTTTGGTAACTACTTCGACTACTGGGGCCAAG GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

VK_#C7 (SEQ ID NO:96)

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCGGGAGAGA AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTGGAACCCAAAAG AACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTAC TGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTAC TGCAAGCAATCTTATAATCTGTTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA CGG

2. Измерение комплекса MASP-2/C1-INH в образцах сыворотки, полученных у субъектов в продольном исследовании COVID-19

Субъекты: Как описано в Примере 24, в настоящее время проводится исследование по измерению активации комплемента у различных категорий субъектов, у которых образцы плазмы и сыворотки для получения лонгитудинальных данных забирают у различных категорий доноров следующим образом:

Категории:

(1) доноры с острым или пост-острым COVID-19 (также называемым долгим COVID-19),

Пациенты с острым состоянием: образцы пациентов с COVID-19, взятые в течение 15 дней после госпитализации (0-4 дня, 5-10 дней и 11-15 дней).

Выздоровевшие/выздоравливающие пациенты: субъекты через 3 месяца после выздоровления от острого COVID-19 (т.е. пациенты, перенесшие острый COVID-19 и выписанные из больницы).

(2) доноры с положительным результатом теста на SARS-CoV-2 и либо бессимптомные, либо с легкими симптомами, не требующими госпитализации.

(3) неинфицированные медицинские работники (MP) (т.е. серонегативные на SARS-CoV-2)

В анализе, описанном ниже, использовали мАт против MASP-2 #C7, описанное выше, которое было иммобилизовано на микротитрационных планшетах для захвата комплексов MASP-2/C1-INH из человеческой сыворотки или плазмы, и антитела против C1-INH для обнаружения захваченных комплексов. Положительный контроль для этого анализа может быть приготовлен путем инкубирования нормальной человеческой сыворотки (NHS) с маннан-агарозой, искусственной активации ЛП и высвобождения MASP-2/C1-INH в образец. Серийные разведения положительного контроля можно использовать в качестве калибраторов/референсных стандартов для анализа ИФА. Также в качестве калибратора/референсных стандарта можно использовать естественно активированную сыворотку, например, из пула пациентов с COVID-19 или другой группы пациентов, у которых, как известно, активирован MASP-2.

Методы:

(i). Микротитрационные планшеты Nunc Maxisorb покрывали 100 мкл клона захватывающего антитела против MASP-2 #C7 (2 мкг/мл) в карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Микротитрационный планшет блокировали 280 мкл/лунка 1% (в/об) BSA в буфере TBS в течение 1 ч при КТ.

(ii) Активированную контрольную сыворотку подготавливали путем разбавления смешанной нормальной человеческой сыворотки (НЧС) до 20% об/об в Tris-буферизированном растворе хлорида натрия (TBS; 10 мМ Трис-Cl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) с 5 мМ Ca^{2+}. Маннан-агарозу (100 мкл, кат. Sigma M9917) два раза промывали пятью объемами TBS/Ca^{2+} и ресуспендировали до 100 мкл в том же буфере. По 500 мкл 20% сыворотки добавляли к 100 мкл маннан-агарозы и инкубировали при комнатной температуре (КТ) при легком встряхивании или вращении в течение 30 минут. Затем добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ и инкубировали еще 2 минуты. Затем

агарозу центрифугировали, активированную сыворотку аспирировали и хранили при -20°C.

(iii) Серийные разведения приготавливали из активированной контрольной сыворотки (начиная с 20%) и образцов сыворотки (5%) в TBS/Ca^{2+}. Блокирующий буфер удаляли и добавляли в планшет 100 мкл/лунка образцов или контрольной сыворотки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты три раза промывали 280 мкл TBS/Ca^{2+}/0,05% Tween 20 (промывочным буфером).

(iv) Добавляли 100 мкл/лунка детектирующего Ат против C1-INH (аффинно-очищенного кроличьего поликлонального антитела против C1-INH, кат. Proteintech 12259-1-AP, разведенного 1:2000 в TBS/Ca^{2+}) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

(v) Затем планшет 3 раза промывали, как описано выше. Добавляли 100 мкл/лунка HRP-конъюгата против иммуноглобулина кролика (Sigma, 1:5000) и инкубировали еще 45 мин.

(vi) Затем планшет 3 раза промывали, как описано выше, и добавляли 100 мкл/лунка субстрата TMB. При появлении синего окрашивания добавляли 50 мкл/лунка 2H H_2SO_4 для остановки реакции и измеряли $OD_{450\ нм}$.

Результаты:

На ФИГУРЕ 60 графически проиллюстрированы результаты анализа ИФА, измеряющего комплекс MASP-2/C1-INH в 5% сыворотке пациентов с острым COVID (16 образцов от 3 пациентов <14 дней после госпитализации), выздоравливающих пациентов (n=15), серопозитивного персонала (n=15) и серонегативного персонала (n=34). Результаты показали активацию лектинового пути, измеренную как количество комплекса MASP-2/C1-INH в процентах от количества, наблюдаемого в искусственно активированной контрольной сыворотке. Как показано на ФИГУРЕ 60, в сыворотке больных острым COVID-19 (<14 дней после госпитализации) наблюдали значимо более высокое количество комплекса MASP-2/C1-INH (в 2-3 раза выше) по сравнению с выздоравливающими пациентами, серопозитивным персоналом и серонегативным персоналом ($p<0,0001$ дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннетта).

На ФИГУРЕ 61 графически проиллюстрировано количество комплекса MASP-2/C1-INH, присутствующего у 3 пациентов с острым COVID-19 (#2, #3 и #4) при поступлении в стационар и через 14 дней после поступления. Красная линия в нижней части графика показывает количество MASP-2/C1-INH, обнаруженное в группе здоровых серонегативных медицинских работников.

Как описано выше, активация лектинового пути (ЛП) приводит к образованию жидкофазного комплекса MASP-2/C1-INH. Как показано на ФИГУРАХ 60 и 61, активация ЛП у пациентов с острым COVID-19 остается высокой через 14-15 дней после поступления в стационар.

ПРИМЕР 26

Иммуноанализ на основе гранул для измерения комплексов MASP-2/C1-INH и

C1s/C1-INH

Теоретические основы/обоснование:

Сериновые протеазы C1s и маннан-связывающий лектин-ассоциированная сериновая протеаза-2 (MASP-2) системы комплемента циркулируют в плазме в виде зимогенов. C1s является частью комплекса C1 классического пути (КП) вместе с другой сериновой протеазой, C1r, и распознающим компонентом C1q. MASP-2 связана с одной из нескольких молекул распознавания паттернов лектинового пути (ЛП). В обоих случаях формы зимогенов свободно связаны с ингибитором сериновой протеазы C1-INH. При активации КП или ЛП зимогены расщепляются на две цепи, связанные дисульфидной связью. Расщепленные C1 и MASP-2 являются активной формой ферментов, которые расщепляют нижестоящие компоненты комплемента C4 и C2. Активированные MASP-2 и C1s регулируются C1-INH, который образует стабильный комплекс 1:1 с этими сериновыми протеазами. Таким образом, уровень комплекса C1s/C1-INH и комплекса MASP-2/C1-INH в образце обеспечивает четкий количественный показатель недавней активации КП или ЛП соответственно.

Как описано в Примере 25, в анализе ИФА, в котором измеряли уровни комплекса MASP-2/C1-INH в 5% сыворотке больных острым COVID, выздоравливающих пациентов, серопозитивного и серонегативного персонала, было установлено, что значительно более высокое количество комплекса MASP-2/C1-INH (в 2-3 раза выше) наблюдали в сыворотке больных острым COVID-19 (<14 дней после госпитализации) по сравнению с выздоравливающими пациентами, серопозитивным персоналом и серонегативным персоналом ($p<0,0001$ дисперсионный анализ с апостериорнным кпитерием Даннетта).

В этом Примере описана разработка чувствительного анализа, пригодного для скрининга образцов отдельных пациентов при концентрациях сыворотки меньше 10% (т.е. от 1% до 5%) на присутствие и/или количество комплекса MASP-2/C1-INH и комплекса C1s/C1-INH, который включал перенос сэндвич-анализов в формат флуоресцентного анализа на основе гранул и их мультиплексирование с использованием платформы Luminex.

Методы:

В этом Примере представлен дальнейший анализ уровней комплекса MASP-2/C1-INH, а также анализ уровней комплекса C1s/C1-INH в образцах больных острым COVID-19, выздоравливающих пациентов, серопозитивного и серонегативного персонала с использованием высокопроизводительного иммунофлуоресцентного анализа на основе гранул, проведенного с использованием технологии Luminex xMAP (Multi-Analyte Profiling).

Анализ Luminex комплексов MASP-2/C1-INH и C1s/C1-INH

Как описано в настоящем документе, комплексы MASP-2/C1-INH и C1s/C1-INH являются специфическими биомаркерами активации лектинового и классического путей соответственно. Для измерения этих биомаркеров разработали мультиплексный флуоресцентный сэндвич-анализ на основе гранул, в котором захватывающее антитело

(связанное с гранулами) направлено против сериновой протеазы, а детектирующее антитело направлено против C1-INH.

Как показано на ФИГУРЕ 62, в мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе на основе гранул используются антитела против C1s или антитела против MASP-2, иммобилизованные на полистирольных микросферах или магнитных полистирольных микросферах (т.е. гранулах), для захвата комплексов сериновой протеаза/C1-INH (т.е. аналита) из человеческой сыворотки или плазмы, и антитела против C1-INH в качестве детектирующего антитела для обнаружения захваченных комплексов.

Хотя анализ, описанный в данном примере, основан на технологии Luminex xMAP (Multi-Analyte Profiling), специалистам в данной области будет понятно, что для практической реализации заявленного изобретения могут применяться альтернативные иммунофлуоресцентные анализы на основе гранул.

Анализ на основе гранул могут быть мультиплексированы путем покрытия одного набора флуоресцентных гранул моноклональным антителом (мАт) против MASP-2, а другого - моноклональным антителом (мАт) против C1s с другим флуоресцентным спектром.

Референсный стандарт положительного контроля для комплексов MASP-2/C1-INH подготавливали с использованием стандартной смешанной сыворотки или плазмы, взятой у больных острым COVID-19, как показано на стандартных кривых, представленных на ФИГУРЕ 63, для обнаружения комплекса MASP-2/C1-INH с использованием мАт C8 против MASP-2 в качестве захватывающего антитела. Как показано на ФИГУРЕ 63, анализ на основе гранул позволяет обнаруживать комплекс MASP-2/C1-INH меньше чем в 10% плазме или сыворотке пациентов с острым COVID-19 (т.е. от 0,1% до 10% плазмы или сыворотки, например, от 0,5% до 8% или от 0,5% до 7,5%, например, от 1% до 5% сыворотки или плазмы).

В альтернативе положительный контроль для комплексов MASP-2/C1-INH может быть получен путем инкубирования нормальной человеческой сыворотки с маннан-агарозой, вызывая искусственную активацию пектинового пути (ЛП) и высвобождение комплекса MASP-2/C1-INH в образец. Аналогичным образом, положительный контроль для комплексов C1s/C1-INH может быть получен путем инкубирования нормальной человеческой сыворотки с иммунными комплексами, вызывая искусственную активацию КП и высвобождение комплекса C1s/C1-INH в образец. В качестве калибраторов могут использоваться серийные разведения положительного контроля.

В качестве другой альтернативы стандарты и положительные контроли могут быть приготовлены путем смешивания рекомбинантного C1-INH и либо рекомбинантного C1, либо рекомбинантного MASP-2 в стехиометрических количествах, очистки полученных комплексов C1s/C1-INH или MASP-2/C1-INH с помощью эксклюзионной хроматографии и их количественной оценки с помощью гель-электрофореза и/или анализа методом Бредфорда или измерения оптической плотности при 280 нм, как дополнительно описано в Примере 27.

Методы анализа на основе гранул:

Магнитные гранулы, покрытые антителами: Панель моноклональных антител, которые, как известно, связывались с MASP-2 и C1, тестировали в качестве захватывающих антител. Антитела разбавляли до 50 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) и иммобилизовали путем сшивания карбодиимидом на магнитных полистирольных микросферах MagPlex (Luminex) при использовании набора для связывания антител xMAP, как описано в Luminex (xMAP) Cookbook (4-е издание). После связывания любые оставшиеся реакционноспособные сайты на гранулах блокировали при инкубировании с PBS, содержащим 0,05% TWEEN 20, pH 7,4 (PBS TBN). Покрытые BSA гранулы были подготовлены в качестве отрицательного контроля. Гранулы MagPlex с различными спектрами испускания использовались в качестве гранул, покрытых антителом против C1s, антителом против MASP-2 и BSA, что позволило мультиплексировать анализ.

Методика анализа. Гранулы MagPlex, связанные с антителами и BSA, разводили в буфере для анализа PBS-TBN до конечной концентрации 50 микросфер/мкл каждого типа гранул. Аликвоты по 50 мкл этой смеси вносили в каждую лунку 96-луночного планшета. В лунки добавляли равные объемы плазмы или сыворотки, разведенные в PBS-TBN, перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере. Гранулы промывали 3 раза буфером для анализа, задерживая их на магнитном сепараторе, аспирировав супернатант и добавив 100 мкл свежего буфера для анализа PBS-TBN. После промывки гранулы ресуспендировали в 50 мкл буфера для анализа и связанный лиганд определяли путем добавления биотинилированного поликлонального антитела против C1-INH (R&D Systems, BAF2488), разведенного 1:1000 в буфере для анализа PBS-TBN. Гранулы инкубировали с детектирующим антителом в течение 30 мин при комнатной температуре, затем 3 раза промывали, как описано выше. Стрептавидин R-фикоэритрин (SAPE; Thermo Fisher Scientific) разбавляли до 1 мкг/мл в буфере для анализа, добавляли по 100 мкл в каждую лунку, перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки, как указано выше, 50-75 мкл каждой реакции анализировали на анализаторе Luminex в соответствии с руководством к системе.

Отбор антител: В предварительных экспериментах, разработанных для тестирования пар захватывающих и детектирующих антител, контрольную сыворотку для анализа MASP-2/C1-INH приготовили путем инкубирования нормальной человеческой сыворотки с маннан-агарозой, вызывая искусственную активацию ЛП и высвобождение MASP-2/C1-INH в образец. Аналогичным образом, положительный контроль для комплексов C1s/C1-INH подготавливали путем инкубирования нормальной человеческой сыворотки с овечьим антителом против ЧСА, с образованием иммунных комплексов in situ для искусственной активации КП и высвобождения C1s/C1-INH в образец. Серийные разведения этих сывороток в диапазоне от 1:10 до 1:1280 исследовали, как описано выше. В качестве контроля использовали: неактивированную НЧС, покрытые BSA гранулы, реакции без сыворотки (только буфер) и смеси без добавления детектирующего антитела. Было показано, что следующие мАт хорошо работают в качестве захватывающих антител.

- Гуманизированное мышиное мАт против MASP-2 #C8

- Аффинно-очищенное поликлональное антитело против C1s, Proteintech (14554-1-AP)

Эти захватывающие антитела давали прямую логарифмическую/линейную зависимость между концентрацией образца и интенсивностью флуоресценции при разведении образца от 1:10 до 1:640, причем до фоновых уровней сигнал падал при 1:1280. Клон мАт против MASP-2 8B5 (Hycult Biotech), ранее успешно использовавшийся в сэндвич-ИФА, показал низкую эффективность в анализе Luminex, с плохой чувствительностью и низким отношением сигнал/шум.

Иллюстративная методика анализа

(i) покрыть 250 мкл полистирольных или магнитных полистирольных микрогранул (например, гранул Magplex) 12,5 мкг захватывающего антитела в 250 мкл фосфатно-солевого буфера при использовании набора для присоединения антител xMAP, в соответствии с описанием производителя (см. Luminex (xMAP) 4th Edition). Было показано, что следующие моноклональные антитела работают как захватывающие антитела.

- захватывающее Ат против MASP-2, клон #C8

- аффинно-очищенное поликлональное антитело против C1s, номер по кат. 14554-1-AP, Proteintech

Захватывающие антитела должны быть пришиты к определенным наборам гранул, по одному на каждое антитело.

(ii) для приготовления активированной контрольной сыворотки разбавить смешанную нормальную человеческую сыворотку до 20% об/об Tris-буферизированного раствора хлорида натрия (TBS; 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) с 5 мМ Ca^{2+}. Два раза промыть 100 мкл маннан-агарозы (Sigma кат. M9917) пятью объемами TBS/Ca^{2+} и ресуспендировать до 100 мкл в том же буфере. Добавить 500 мкл 20% сыворотки к 100 мкл маннан-агарозы и инкубировать при комнатной температуре (КТ) с мягким встряхиванием или вращением в течение 30 минут. Добавить ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ и инкубировать еще 2 минуты, затем осадить агарозу с помощью центрифугирования и аспирировать активированную сыворотку. Хранить при -20°C.

(iii) Отобрать соответствующие наборы микросфер, сшитых с антителами, и провести анализ следующим образом:

• Микросферы ресуспензировать путем встряхивания на вортексе и обработке ультразвуком

• Приготовить рабочую смесь микросфер путем разбавления стоковых суспензий сшитых микросфер до конечной концентрации 50 микросфер каждого набора/мкл в буфере для анализа (TBS).

• Аликвоту 50 мкл рабочей смеси микросфер перенести в соответствующие лунки 96-луночного планшета.

• Добавить 50 мкл буфера для анализа (TBS) в каждую фоновую лунку.

• Добавить 50 мкл стандарта или образца в соответствующие лунки.

• Аккуратно перемешать реакции при пипетировании несколько раз с помощью многоканального дозатора.

• Закрыть планшет и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере, установленном примерно на 800 об/мин.

• Поместить планшет в магнитный сепаратор на 30-60 секунд для разделения.

• Использовать многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Оставить планшет в магнитном сепараторе для следующих этапов промывки:

o Добавить в каждую лунку по 100 мкл буфера для анализа.

o Использовать многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Удалить планшет из магнитного сепаратора и ресуспендировать микросферы в 50 мкл буфера для анализа, осторожно перемешивая несколько раз с помощью многоканального дозатора.

• Разбавить биотинилированное детектирующее антитело в буфере для анализа. Подходящее детектирующее антитело представляет собой аффинно-очищенное поликлональное антитело против C1-INH, номер по кат. R&D system BAF2488, разведенное 1:1000.

• Добавить в каждую лунку по 50 мкл разбавленного детектирующего антитела.

• Аккуратно перемешать реакции при пипетировании несколько раз пипетируя с помощью многоканального дозатора.

• Закрыть планшет и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов, установленном примерно на 800 об/мин.

• Поместить планшет в магнитный сепаратор и оставить на 30-60 секунд для разделения.

• Использовать многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Оставить планшет в магнитном сепараторе для следующих этапов промывки:

o Добавить в каждую лунку по 100 мкл буфера для анализа.

o Использовать многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Извлечь планшет из магнитного сепаратора и ресуспендировать микросферы в 50 мкл буфера для анализа, осторожно пипетируя несколько раз с помощью многоканального дозатора.

• Разбавить репортерный конъюгат стрептавидина, R-фикоэритрина (SAPE) до 1 мкг/мл в буфере для анализа.

• Добавить в каждую лунку по 50 мкл разбавленного SAPE.

• Аккуратно перемешать реакции при пипетировании несколько раз с помощью многоканального дозатора.

• Накрыть планшет и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов, установленном примерно на 800 об/мин.

• Поместить планшет в магнитный сепаратор и оставить на 30-60 секунд для разделения.

• Используйте многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Оставить планшет в магнитном сепараторе для следующих этапов промывки:

o Добавить в каждую лунку по 100 мкл буфера для анализа.

o Использовать многоканальную пипетку для тщательной аспирации супернатанта из каждой лунки.

• Извлечь планшет из магнитного сепаратора и ресуспендировать микросферы в 100 мкл буфера для анализа, осторожно пипетируя несколько раз с помощью многоканального дозатора.

• Провести анализ 50-75 мкл на анализаторе Luminex в соответствии с руководством к системе.

мАт против MASP-2 #C8

VH мАт #C8 (SEQ ID NO:97)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSATYWGVTWIRQPPGKALEWLAHIFS SDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTL VTVSS

VL мАт #C8 (SEQ ID NO:98)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL

Результаты:

На ФИГУРЕ 63 графически проиллюстрировано обнаружение комплексов MASP-2/C1-INH в смешанной человеческой сыворотке пациентов с острым COVID-19 в анализе на основе гранул с использованием мАт против MASP-2 #C8 в качестве захватывающего антитела в сравнении с покрытыми BSA контрольными гранулами.

ПРИМЕР 27

Способ получения комплексов MASP-2/C1-INH для применения в качестве референсных стандартов

Методы:

1. Смешать человеческий MASP-2 CCP1/CCP2/SP6His (мол. вес 43740) с ингибитором C1-эстеразы (Sigma E0518 (из человеческой плазмы) мол. вес 105000 в молярном соотношении MASP-2:ингибитор C1 1:1,5 (всего 300 мкг).

2. Встряхивать со скоростью 400 об/мин в пробирках эппендорф в течение 60 минут, 37°C.

3. Охладить в течение ночи

4. Очистить с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC):

ТАБЛИЦА 16: SEC-анализ и очистка

Пик	Удерживание	% площади
1	8,478	56,09
2	10,588	40,6
3	13,242	3,31

Пик 1 и Пик 2 собирали после SEC и разделяли в невосстанавливающем геле вместе с контрольным MASP-2 CCP1/CCP2/SP6HIS (мол. вес 43740) и ингибитором C1-эстеразы (мол. вес 105000).

Результаты:

ФИГУРА 64 представляет собой фотографию невосстанавливающего геля, на который наносили по 6 мкг образцов, полученных при SEC-очистке рекомбинантных комплексов MASP-2/C1-INH, где: дорожка 1: Пик 1 проскок; дорожка 2: пик 1 концентрированный; дорожка 3: пик 2 проскок; дорожка 4: пик 2 концентрированный; дорожка 5: неочищенная смесь; дорожка 6: MASP-2 CCP1/2/SP (43740 кД); дорожка 7: C1-ингибитор (100 кДа).

Как показано на ФИГУРЕ 64, очищенный комплекс MASP-2/C1-INH присутствует в концентрированном Пике 1. Этот рекомбинантный комплекс можно применять в качестве референсного стандарта в анализе на основе гранул, как описано в Примере 26.

ПРИМЕР 28

Пациенты с острым COVID-19, протестированные на уровни комплексов MASP-2/C1-INH и C1s/CI-INH

Методы:

Как описано в Примерах 24 и 25, в настоящее время продолжается исследование по измерению активации комплемента для получения лонгитудинальных данных в образцах плазмы и сыворотки, взятых у различных категорий пациентов с COVID-19 и здоровых добровольцев. Как описано в настоящем документе, острая инфекция COVID-19 приводит к активации комплемента, декомплементации и высвобождению продуктов активации комплемента, например, C5a.

Как описано в этом Примере, в рамках этого продолжающегося продольного исследования сорок пациентов с тяжелым острым COVID-19 были протестированы на образование комплекса MASP-2/C1-INH и образование комплекса C1s/C1-INH с помощью анализа на основе гранул, описанного в Примере 26.

Сорок (40) пациентов с тяжелым острым COVID-19, исследованных в данном Примере, были набраны в Королевской больнице Папворт, Великобритания. Клинические баллы по шкале ВОЗ для этих пациентов варьировали от 3 до 7, причем 19 из них нуждались в экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО). Девятнадцать пациентов выжили и были вызваны повторно для последующего наблюдения через 3 месяца после выписки; 21 скончался от болезни. Тридцать здоровых медицинских работников (МР), которые получили положительный тест на COVID-19, но не были госпитализированы, и 30 неинфицированных МР служили в качестве контроля.

Образцы плазмы, взятые у различных субъектов в указанное время (показанное

время указано с момента поступления в стационар), разбавляли 1:50 и исследовали с помощью дуплексного анализа Luminex на основе гранул на количество комплекса MASP-2/C1-INH и комплекса C1s/C1-INH, как описано в Примере 26.

Измерение гемолитической активности комплемента (CH50)

Антителонаправленный комплемент-опосредованный лизис эритроцитов овцы (SE) измеряли с использованием SE, покрытых кроличьим антителом против IgG овцы, следующим образом. Овечьи эритроциты (Oxoid) 3 раза промывали буфером GVB (10 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 0,1% в/об желатина), содержащим 10 мМ ЭДТА. Конечную концентрацию эритроцитов доводили до 1×10^9/мл. Эритроциты сенсибилизировали при инкубировании с антителами против овечьих эритроцитов (Sigma S1389, разведенных 1:200) при 37°C с осторожным встряхиванием в течение 30 минут. Наконец, эритроциты промывали буфером GVB, содержащим 2 мМ Ca^{2+} и 1 мМ Mg^{2+} (GVB^{++}). Образцы сыворотки последовательно разводили в 100 мкл буфера GVB^{++} в 96-луночных планшетах и в каждую лунку добавляли 10^7 эритроцитов в равном объеме GVB^{++}. Лунки, содержащие только буфер, использовали в качестве отрицательного контроля. Лунки, содержащие воду вместо буфера/плазмы, использовали в качестве положительного контроля (номинально 100% лизис). После 30 минут инкубирования при 37°C планшеты центрифугировали, отбирали по 100 мкл супернатанта и определяли высвободившийся гемоглобин путем измерения оптической плотности при 405 нм. Процент гемолиза вычисляли и наносили на график в зависимости от разведения плазмы для определения CH50.

Циркулирующий C5a измеряли с помощью запатентованного сэндвич-ИФА, поставляемого R&D systems (номер по кат. DY2037).

Результаты:

На ФИГУРЕ 65 графически проиллюстрирован уровни комплекса MASP-2/C1-INH у пациентов с острым COVID-19, определенные в дуплексном анализе на основе гранул, описанном в настоящем документе. Как показано на ФИГУРЕ 65, уровни комплекса MASP-2/C1-INH были повышены на протяжении всей острой фазы болезни по сравнению со здоровыми контрольными субъектами, что указывает на активацию лектинового пути при остром COVID-19. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 65, через три месяца после выписки из больницы у выживших наблюдали сниженные, а не нормальные уровни комплекса MASP-2/C1-INH. Напротив, у людей с легким COVID-19 (серопозитивные медицинские работники (HCW)) не наблюдали повышенных уровней MASP-2/C1-INH. N=40 для госпитализированных пациентов, 30 для негоспитализированных случаев COVID-19, 30 для здоровых контрольных субъектов. Анализ данных проводили при использовании одностороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннетта для множественных сравнений.

На ФИГУРЕ 66 графически проиллюстрированы уровни комплекса C1s/C1-INH у пациентов с острым COVID-19, определенные в дуплексном анализе на основе гранул, описанном в настоящем документе. Как показано на ФИГУРЕ 66, уровни комплекса

C1s/C1-INH были повышены на протяжении всей острой фазы болезни по сравнению со здоровым контролем, что свидетельствует об активации классического пути при остром COVID-19. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 66, через три месяца после выписки из стационара у выживших наблюдали пониженные, а не нормальные уровни комплекса C1s/C1-INH. Напротив, люди с легким COVID-19 (серопозитивные медицинские работники (HCW)) не показали повышенных уровней C1s/C1-INH. N=40 для госпитализированных пациентов, 30 для негоспитализированных случаев COVID-19, 30 для здоровых контрольных субъектов. Анализ данных проводили при использовании одностороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннетта для множественных сравнений. Нужно отметить, что уровни комплекса C1s/C1inh согласуются с титром антител против COVID-19 и антителозависимым отложением комплемента (ADCD) (данные не показаны).

На ФИГУРЕ 67 графически проиллюстрированы значения CH50 у пациентов с острым COVID-19, выздоравливающих пациентов, серопозитивного и серонегативного персонала в продольном исследовании, описанном в данном примере. Как показано на ФИГУРЕ 67, значения CH50 были ниже в острой фазе болезни по сравнению со здоровым контролем, что указывает на расходование и активацию комплемента.

На ФИГУРЕ 68 графически проиллюстрированы значения C5a у пациентов с острым COVID-19, выздоравливающих пациентов, серопозитивного и серонегативного персонала в продольном исследовании, описанном в данном примере. Как показано на ФИГУРЕ 68, значения C5a были выше в острой фазе заболевания по сравнению со здоровым контролем, что указывает на активацию комплемента.

В совокупности результаты показывают, что расходование и активация комплемента происходит в ранней острой фазе COVID-19 даже при отсутствии антител против COVID-19.

Как показано на ФИГУРАХ 65 и 66, уровни комплексов MASP-2/C1-INH и комплексов C1s/C1-INH были значительно повышены у всех госпитализированных пациентов с острым COVID-19. У выживших пациентов уровни комплексов сериновой протеазы/C1-INH постепенно снижались до нормы через три месяца после выписки, хотя у подгруппы пациентов все еще присутствовали повышенные уровни, поднимая значения выше контрольного набора и указывая на продолжающуюся активацию комплемента.

Эффективность анализа: Обзор

Как описано в настоящем документе, острая инфекция COVID-19 приводит к активации комплемента, декомплементации и высвобождению продуктов активации комплемента, например, C3a и C5a. Были протестированы анализы комплекса C1-INH на основе гранул при использовании плазмы 40 пациентов с тяжелым острым COVID-19, которые были набраны в Королевской больнице Папворт, Великобритания. Клинические баллы по шкале ВОЗ у пациентов варьировали от 3 до 7, причем 19 из них нуждались в экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО). Девятнадцать пациентов выжили; 21 скончался от болезни. Тридцать неинфицированных медицинских работников (MP)

служили в качестве контроля. В качестве стандартов использовали серийные разведения смешанной плазмы пациентов с острой фазой (диапазон 1:10-1:1280). Отдельные образцы разводили 1:50 в буфере для анализа. Высокий и низкий стандарт (смешанная острая и НЧС) были включены в 3 отдельных локации на каждом планшете с целью определения вариаций внутри и между планшетами.

Стандартные кривые для обоих анализов представляли собой прямую логарифмическую/линейную зависимость с используемыми разведениями плазмы в диапазоне от 1:20 до 1:640. Абсолютный флуоресцентный сигнал для комплекса C1s/C1-INH примерно в 10 раз выше, чем для комплекса MASP-2/C1-INH, вероятно, отражая различие по концентрации в сыворотке между MASP-2 и C1s.

Комплексы MASP-2/C1-INH и комплексы C1s/C1-INH были значительно повышены у всех госпитализированных пациентов с острым COVID-19 по сравнению со здоровым контролем, что указывает на активацию как ЛП, так и КП.

ПРИМЕР 29

Лечение нарсоплимабом снижает уровни комплекса MASP-2/C1-INH при COVID-19 и приводит к лучшему клиническому результату.

Теоретические основы/обоснование:

Как описано в Примерах 20, 21 и 22, было продемонстрировано, что лектиновый путь способствует повреждению легких, связанному с острым COVID-19, и что репрезентативное антитело, ингибирующее MASP-2, нарсоплимаб, эффективно облегчает легочные симптомы у пациентов при остром COVID-19. В этом примере результаты пациентов с острым COVID-19, получавших нарсоплимаб, как описано в Примерах 20, 21 и 22, анализировали для определения влияния нарсоплимаба на уровень комплекса MASP-2/C1-INH.

Методы:

Восемь пациентов, страдающих острым COVID-19, были госпитализированы в ОРИТ в Бергамо, Италии, и получали лечение нарсоплимабом в дозе 4 мг/кг два раза в неделю. Образцы брали при поступлении в стационар (до лечения нарсоплимабом), затем, от начала лечения нарсоплимабом, образцы брали в дни 3-4, 7-8 и день 9 до выписки. Одновременно с этим было набрано 16 здоровых контрольных субъектов.

Образцы исследовали на содержание CH50, C5a и комплекса MASP-2/C1-INH при использовании анализа на основе гранул, описанного в Примере 26.

Результаты:

На ФИГУРЕ 69 графически проиллюстрированы уровни комплекса MASP-2/C1-INH в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 при поступлении (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (день 3-4 после начала лечения; день 7-8, день 9 до выписки) в сравнении с 16 здоровыми субъектами из контрольной группы. Как показано на ФИГУРЕ 69, уровни комплекса MASP-2/C1-INH были повышены у пациентов с острым COVID при поступлении в больницу (до лечения нарсоплимабом) в сравнении со здоровыми субъектами. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 69, в дни

3-4 после лечения нарсоплимабом наблюдали резкое снижение уровней комплекса MASP-2/C1-INH, сравнимое с уровнем, наблюдаемым у здоровых контрольных субъектов, которое сохранялось до выписки. С другой стороны, у пациентов с острым COVID-19 из продольного исследования, описанного в Примере 28, которые не получали нарсоплимаб, как показано на ФИГУРЕ 65, наблюдали повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH через 0-4 дня, 5-10 дней и 11 день выписки со снижением уровня комплекса MASP-2/C1-INH при последующем наблюдении через 3 месяца, который все еще был выше, чем у здоровых контрольных субъектов.

На ФИГУРЕ 70A графически проиллюстрированы значения CH50 в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 при поступлении (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (дни 3-4 после начала лечения; дни 7-8, день 9 до выписки) по сравнению с 16 здоровыми контрольными субъектами.

Как показано на ФИГУРЕ 70A, значения CH_{50} у пациентов с острым COVID-19 при поступлении (до лечения нарсоплимабом) были ниже, чем у здоровых субъектов из контрольной группы. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 70A, в дни 3-4 после лечения нарсоплимабом наблюдали увеличение уровня CH_{50} до диапазона нормальных значений, который продолжал повышаться ко дню 7-8 и оставался в диапазоне нормальных значений на день 9 до выписки. С другой стороны, у пациентов с острым COVID-19 из продольного исследования, описанного в Примере 28, которые не получали нарсоплимаб, как показано на ФИГУРЕ 67, наблюдали более низкое значение CH_{50} по сравнению с серонегативным персоналом в дни 0-4, и этот более низкий уровень сохранялся в дни 5-10 и дни 11-15, и в конечном итоге повышался у выздоравливающих пациентов при последующем наблюдении через 3 месяца до нормального уровня.

На ФИГУРЕ 70B графически проиллюстрированы значения C5a в образцах 8 пациентов с острым COVID-19 при поступлении (до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (дни 3-4 после начала лечения; дни 7-8, день 9 до выписки) в сравнении с 16 здоровыми контрольными субъектами.

Как показано на ФИГУРЕ 70B, значения C5a у пациентов с острым COVID-19 при поступлении (до лечения нарсоплимабом) были значительно выше, чем у здоровых субъектов в контрольной группе. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 70B, значения C5a резко снижались в дни 3-4 после лечения нарсоплимабом и продолжали снижаться в дни 7-8 и день 9 выписки почти до нормальных уровней. С другой стороны, у пациентов с острым COVID-19 из продольного исследования, описанного в Примере 28, которые не получали нарсоплимаб, как показано на ФИГУРЕ 68, наблюдали значительно повышенные значения C5a в дни 0-4 по сравнению с серонегативным персоналом, которые постепенно снижались, но оставались выше нормы в дни 5-10 и дни 11-15, и затем в конечном итоге снижались до нормальных уровней при последующем наблюдении через 3 месяца (выздоравливающие пациенты).

В совокупности эти результаты демонстрируют, что у пациентов с острым COVID-19 наблюдается активация и расходование комплемента при поступлении в стационар, и

что лечение нарсоплимабом быстро снижает активацию и расходование комплемента. Также было продемонстрировано, что уровень комплекса MASP-2/C1-INH указывает на статус активации комплемента у пациентов с COVID-19, который оказывается высоким при поступлении в больницу и быстро снижается при лечении нарсоплимабом. Таким образом, уровень комплекса MASP-2/C1-INH можно использовать для определения необходимости лечения нарсоплимабом, а также для контроля эффективности лечения нарсоплимабом.

Обсуждение:

Как описано в этом Примере, было исследовано влияние лечения нарсоплимабом на активацию комплемента во время острого COVID-19. Маркеры активации и истощения комплемента были исследованы в лонгитудинальных образцах плазмы, взятых у восьми пациентов, госпитализированных с острым Covid-19 (баллы по шкале ВОЗ 3-7). Образцы, взятые у здоровых медицинских работников, служили в качестве контроля.

Непосредственно перед лечением у всех пациентов наблюдали декомплементацию (низкое значение CH_{50}) и обнаружили признаки активации альтернативного пути и продукции анафилатоксинов (продукции Bb и C5a). При использовании нового флуоресцентного иммуноанализа на основе гранул, описанного в настоящем документе, для измерения комплексов C1s/C1-INH и MASP-2/C1-INH, специфических маркеров активации классического и лектинового путей соответственно, было обнаружено значимо повышенные уровни обоих комплексов у всех пациентов до лечения. Лечение нарсоплимабом приводило к быстрому и устойчивому снижению комплексов MASP-2/C1Inh и соответствующему снижению продукции C5a. Уровни C1s/C1Inh оставались высокими на протяжении всей острой фазы.

Взятые в совокупности с предыдущими клиническими результатами, эти данные дают основание предполагать, что специфичное воздействие на лектиновый путь с применением нарсоплимаба может быть достаточным для снижения активации комплемента и снижения анафилатоксинов до уровня ниже порога сохранения ОРДС, даже в случае присутствия продолжающейся активации классического пути.

Эти данные демонстрируют, что в самом начале тяжелого COVID-19 активация лектинового пути чрезвычайно высокая. Эта чрезмерная активация лектинового пути вызывает расходование компонентов комплемента, общих для лектинового и классического путей, нарушая функцию классического пути. Оценка образцов крови из исследования в Бергамо показывает, что ингибирование лектинового пути посредством нарсоплимаба может восстанавливать потерю функциональной активности классического пути, вызванную неконтролируемым расходованием вследствие гиперактивации лектинового пути. Эти результаты демонстрируют, что комплекс MASP-2/C1-INH может служить в качестве раннего индикатора тяжелого COVID-19 и в качестве средства для оценки терапевтического ответа у пациентов с COVID-19, проходящих лечение.

ПРИМЕР 30

Дополнительное подтверждение того, что лечение нарсоплимабом снижает уровни

комплекса MASP-2/C1-INH при COVID-19 и приводит к улучшению клинического результата.

Теоретические основы/обоснование:

Как описано в Примерах 20, 21, 22 и 23, было продемонстрировано, что лектиновый путь способствует поражению легких, связанному с острым COVID-19, и что репрезентативное MASP-2-ингибирующее антитело, нарсоплимаб, эффективно облегчает легочные симптомы у пациентов с острым COVID-19. В этом Примере пациенты, страдающие острым COVID-19, проходили лечение нарсоплимабом, как описано в Примерах 20, 21 и 22, для определения влияния нарсоплимаба на уровень комплекса MASP-2/C1-INH. Как описано в Примере 29, было установлено, что у пациентов с острым COVID-19 наблюдается активация и расходование комплемента при поступлении в стационар, и что лечение нарсоплимабом быстро снижает активацию и расходование комплемента. Кроме того, было продемонстрировано, что уровень комплекса MASP-2/C1-INH отражает статус активации комплемента у пациентов с COVID-19, которая оказывается высокой при поступлении в больницу и быстро снижается при лечении нарсоплимабом. В этом примере описан дальнейший анализ лонгитудинальных образцов, полученных у субъектов с острым COVID-19, пациентов, получавших нарсоплимаб (группа, получавшая лечение), в сравнении с лонгитудинальными образцами, полученными у субъектов, страдающих острым COVID-19, которые были госпитализированы в Бергамо в тот же период времени, которые не получали нарсоплимаб (группа, не получавшая лечение), где образцы исследовали на CH50, C5a и комплекс MASP-2/C1-INH с применением иммуноанализа на основе гранул, описанного в Примере 26.

Методы:

Пациенты и контрольные субъекты, включенные в это исследование

Были исследованы лонгитудинальные образцы плазмы 16 пациентов с COVID-19 средней и тяжелой степени; 7 пациентов, получавших нарсоплимаб (которые выздоровели и были выписаны после лечения) и 9 не получавших лечения контрольных субъектов, причем все поступили в отделение интенсивной терапии больницы Папы Джованни XXIII в Бергамо, Италии, в четвертом квартале 2020 года. Все пациенты имели положительный результат ПЦР на SARS- CoV-2, с ОРДС (согласно Берлинским критериям (Ferguson N.D et al., Intensive Care Med 38(10): 1573-82, 2012), требующим как минимум CPAP (непрерывного положительного давления в дыхательных путях). Наиболее тяжелые пациенты были отобраны для лечения нарсоплимабом. Все пациенты получали эноксапарин, дексаметазон и 500 мг азитромицина ежедневно, но пациенты с активными системными бактериальными или грибковыми инфекциями, требующие дополнительной антимикробной терапии, не подходили для лечения нарсоплимабом.

В когорте получавших лечение пациентов, нарсоплимаб (4 мг/кг) вводили внутривенно два раза в неделю в течение 2-4 недель. Кровь собирали перед введением каждой дозы нарсоплимаба, а затем два раза в неделю. Плазму с цитратом приготавливали

и замораживали при -80°C до анализа. Параллельно забирали образцы у пациентов с COVID-19, которые не получали нарсоплимаб. Аналогичным образом, нормальную контрольную плазму собирали у семнадцати серонегативных добровольцев (медицинских работников). Образцы исследовали на CH50, C5a и комплекс MASP-2/C1-INH с использованием анализа на основе гранул, описанного в Примере 26.

Измерение гемолитической активности комплемента (CH50)

Антителонаправленный комплемент-опосредованный лизис эритроцитов овцы (SE) измеряли с использованием SE, покрытых кроличьим антителом против IgG овцы, следующим образом. Овечьи эритроциты (Oxoid) 3 раза промывали буфером GVB (10 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 0,1% в/об желатина), содержащим 10 мМ ЭДТА. Конечную концентрацию эритроцитов доводили до 1×10^9/мл. Эритроциты сенсибилизировали при инкубировании с антителами против овечьих эритроцитов (Sigma S1389, разведенных 1:200) при 37°C с осторожным встряхиванием в течение 30 минут. Наконец, эритроциты промывали буфером GVB, содержащим 2 мМ Ca^{2+} и 1 мМ Mg^{2+} (GVB^{++}). Образцы сыворотки последовательно разводили в 100 мкл буфера GVB^{++} в 96-луночных планшетах и в каждую лунку добавляли 10^7 эритроцитов в равном объеме GVB^{++}. Лунки, содержащие только буфер, использовали в качестве отрицательного контроля. Лунки, содержащие воду вместо буфера/плазмы, использовали в качестве положительного контроля (номинально 100% лизис). После 30 минут инкубирования при 37°C планшеты центрифугировали, отбирали по 100 мкл супернатанта и определяли высвободившийся гемоглобин путем измерения оптической плотности при 405 нм. Процент гемолиза вычисляли и наносили на график в зависимости от разведения плазмы для определения CH50.

ИФА анализы C5a

Циркулирующий C5a измеряли с использованием запатентованного сэндвич-ИФА, поставляемого R&D systems (номер по кат. DY2037).

Анализ бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК)

Изоляты K. pneumoniae выращивали в питательном бульоне при 37°C в течение ночи с легким встряхиванием. На следующий день в 10 мл свежего питательного бульона сеяли 100 мкл ночной бактериальной культуры и инкубировали при 37°C с легким встряхиванием до середины логарифмической фазы. Бактериальные культуры собирали, два раза промывали с использованием BBS (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4) и затем доводили до конечной концентрации 1×10^7 КОЕ $мл^{-1}$. 1×10^5 КОЕ инкубировали с 50% сывороткой MP или сывороткой пациентов с острым COVID-19 до и после лечения нарсоплимабом в BBS при 37°C с легким встряхиванием. Через 2 часа отбирали пробы и сеяли на чашку с питательным агаром, на ночь при 37°C. Сыворотки пациентов инкубировали с мукоидом K. pneumoniae (ATCC 43816) в течение 120 минут, и количество выделяемых жизнеспособных бактериальных колоний вычисляли путем измерения снижения количества жизнеспособных бактерий, выделенных после 2-часового инкубирования с каждой сывороткой, в сравнении с термоинактивированной нормальной

человеческой сывороткой (HI-NHS).

Анализ Luminex комплексов MASP-2/C1Inh и C1s/C1Inh

Комплексы MASP-2/C1-INH и C1s/C1-INH являются специфическими маркерами активации лектинового и классического путей соответственно. Для измерения этих маркеров использовали мультиплексный флуоресцентный сэндвич-анализ на основе гранул, как описано в Примере 26.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

В этом исследовании семь тяжелобольных пациентов с COVID-19 получали нарсоплимаб (конечная концентрация 4 мг/кг массы тела, вводимый внутривенно два раза в неделю), и все они выздоровели после лечения. Для сравнения были собраны лонгитудинальные образцы крови в контрольной группе из девяти пациентов с COVID-19, которые находились в ОРИТ в течение того же периода времени, и которые не получали нарсоплимаб (не получавшая лечение группа).

Лечение нарсоплимабом снижает сильно повышенные уровни активации лектинового пути у пациентов с COVID-19 до уровней, наблюдаемых у здоровых контрольных субъектов.

Использовали флуоресцентный анализ на основе гранул, описанный в Примере 26, который авторы изобретения разработали для мониторинга состояния активации лектинового пути (ЛП) и классического пути (КП) посредством обнаружения комплексов MASP-2/C1-INH и C1s/C1-INH в сыворотке/плазме пациентов с COVID-19.

На ФИГУРЕ 71 графически проиллюстрированы уровни комплекса MASP-2C1-INH в образцах 7 пациентов с COVID-19 при поступлении (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (дни 2-4 после начала лечения; дни 6-8 и день 9 до выписки) в сравнении с образцами, полученными у 9 пациентов с COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не получавшие лечение контрольные субъекты) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов (здоровый контроль). Как показано на ФИГУРЕ 71, в начале исследования все пациенты имели высокие уровни комплекса MASP-2/C1-INH, что указывает на активацию лектинового пути. Лечение нарсоплимабом снижало MASP-2/C1-INH до нормального уровня сразу после первой дозы. Уровни комплекса MASP-2/C1-INH в группе, не получавшей лечения, были значительно ($p<0,001$) выше, чем в группе, получавшей лечение, до конца исследования. Анализ результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Напротив, нарсоплимаб не оказывал влияния на продукцию комплекса C1s/C1-INH, вызванную классическим путем, которая оставалась высокой в обеих группах пациентов на протяжении всего исследования (данные не показаны).

Лечение нарсоплимабом уменьшает гипокомплементемию при остром COVID-19

На ФИГУРЕ 72A графически проиллюстрированы значения CH_{50} в образцах 7 пациентов с острым COVID-19 при поступлении (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (дни 2-4 после начала лечения; дни 6-8 и день 9 до

выписки) в сравнении с образцами, полученными у 9 пациентов с острым COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не получавший лечение контроль) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов (здоровый контроль).

На ФИГУРЕ 72B графически проиллюстрированы значения C5a в образцах 7 пациентов с острым COVID-19 при поступлении (день 0, до лечения нарсоплимабом) и после лечения нарсоплимабом (дни 2-4 после начала лечения; дни 6-8 и день 9 до выписки) в сравнении с образцами, полученными у 9 пациентов с острым COVID-19, которые не получали нарсоплимаб (не получавший лечение контроль) в течение того же периода времени, и пула здоровых контрольных субъектов (здоровый контроль).

Как показано на ФИГУРЕ 72A, в начале исследования в плазме крови всех шестнадцати пациентов с COVID-19 наблюдалась тяжелая гипокомплементемия, определяемая по низким значениям CH_{50}. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 72A, лечение нарсоплимабом приводило к немедленному улучшению значений CH_{50}, указывающему на восстановление активации комплемента. В отличие от этого, у не получавших лечения контрольных пациентов с COVID-19 значения CH_{50} были значительно ниже ($p=0,0093$) в течение первых девяти дней исследования, и только незадолго до выписки у них начала восстанавливаться нормальная активация комплемента. Как показано на ФИГУРЕ 72B, при поступлении в отделение интенсивной терапии все пациенты с COVID-19 имели высокие уровни анафилатоксина C5a в сыворотке, отражающие наличие активации комплемента. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 72B, лечение нарсоплимабом снижало уровни C5a в плазме до нормальных уровней через 3 дня после первой дозы, и они оставались нормальными на протяжении всего исследования.

Таким образом, в группе, получавшей нарсоплимаб, значения CH_{50} и C5a возвращались к норме через 3 дня после первой дозы и оставались нормальными в течение всего исследования. В не получавшей лечение группе значения CH_{50} были значительно ниже ($p=0,0093$), а уровни C5a значительно выше ($p=0,023$), чем в группе, получавшей лечение, на протяжении всей оставшейся части исследования. Анализ результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Лечение нарсоплимабом ингибирует опосредованную лектиновым путем активацию комплемента, что обеспечивает восстановление активности классического пути и бактерицидной активности, опосредованной антителами

Комплемент-опосредованный лизис бактерий играет важную роль в защите от микробной инфекции, в особенности против грамотрицательных бактерий. Гипокомплементемия, вызванная тяжелым COVID-19, серьезно снижает способность сыворотки опсонизировать или уничтожать Klebsiella pneumoniae, основное вторичное сопутствующее заболевание при COVID-19. Чтобы определить, может ли нарсоплимаб восстанавливать эту функцию при ее потере, измеряли бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) получавших лечение и не получавших лечение пациентов против K. pneumoniae.

На ФИГУРЕ 73 графически проиллюстрировано количество жизнеспособных бактерий K. pneumoniae после инкубирования сыворотки пациентов с COVID-19 до лечения нарсоплимабом (до лечения) и пациентов с COVID-19 после лечения нарсоплимабом в сравнении с сывороткой пациентов с COVID-19, не получавших лечения нарсоплимабом, в сравнении с нормальной сывороткой здоровых субъектов (NHS) и термоинактивированной нормальной сывороткой здоровых субъектов (HI-NHS). Как показано на ФИГУРЕ 73, значительно более низкое количество бактерий наблюдали при использовании сыворотки пациентов после лечения нарсоплимабом в сравнении с сывороткой, взятой до лечения. Опсонизация K. pneumoniae под воздействием C3b также нарушалась при инкубировании в смешанной сыворотке пациентов (n=6) с острым COVID-19. После введения нарсоплимаба смешанные сыворотки тех же пациентов (n=6) опсонизировали K. pneumoniae при воздействии C3b в такой же степени, что и смешанные нормальные здоровые контроли. Термоинактивированные нормальные здоровые контроли использовались в качестве отрицательного контроля. Анализ результаты проводили при использовании одностороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннетта для множественных сравнений.

Общий обзор результатов:

Как описано в настоящем документе, а также в публикации Rambaldi A. et al., Immunobiology 225(6):152001, 2020, лечение тяжелобольных пациентов с COVID-19 нарсоплимабом, антителом, ингибирующим MASP-2, которое ингибирует лектиновый путь (ЛП), привело к терапевтическому прорыву с быстрым уменьшением проявлений болезни после инфузий.

В этом примере исследовали влияние лечения нарсоплимабом на активацию комплемента при остром COVID-19. Маркеры активации и истощения комплемента исследовали в лонгитудинальных образцах плазмы, взятых у семи пациентов, госпитализированных с острым COVID-19 (оценка по шкале ВОЗ 3-7) и получавших нарсоплимаб, которые выздоровели и были выписаны. Образцы, взятые у здоровых медицинских работников и не получавших лечение пациентов с COVID-19, служили в качестве контроля.

До лечения в образцах плазмы всех пациентов наблюдали низкие уровни CH_{50} и высокие уровни анафилатоксина C5a, маркеры, указывающие на активацию комплемента по всем трем путям активации комплемента. При использовании нового флуоресцентного иммуноанализа на основе гранул для измерения комплексов C1s/C1-INH и MASP-2/C1-INH, специфических маркеров активации классического и лектинового путей соответственно, были обнаружены значительно повышенные уровни обоих комплексов у всех пациентов до лечения. Лечение нарсоплимабом приводило к быстрому и устойчивому снижению комплексов MASP-2/C1-INH и соответствующему снижению продукции C5a. Уровни C1s/C1-INH оставались высокими на протяжении всей острой фазы. Также восстанавливалась бактерицидная активность против грамотрицательных бактерий.

В совокупности с предыдущими клиническими результатами, эти результаты предоставляют дополнительное подтверждение того, что специфичное воздействие на лектиновый путь нарсоплимабом может быть достаточным для снижения активации комплемента и снижения анафилатоксина до уровня ниже порогового для сохранения ОРДС, даже при продолжающейся активации классического пути, и восстановления БАСК, требуемой для успешной защиты против условно-патогенной вторичной инфекции.

Другие варианты осуществления

Все публикации, заявки на патенты и патенты, указанные в данном описании, включены в настоящий документ посредством отсылки.

Различные модификации и вариации описанных способов и композиций согласно изобретению будут очевидны специалистам в данной области без отступления от объема и сущности изобретения. Хотя изобретение было описано в отношении конкретных требуемых вариантов осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно необоснованно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления.

Хотя были проиллюстрированы и описаны иллюстративные варианты осуществления, следует понимать, что в них могут быть внесены различные изменения без отступления от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления изобретения, в котором заявлены исключительные права или привилегия, определены следующим образом:

1. Способ лечения, подавления, облегчения или предотвращения острого респираторного дистресс-синдрома, пневмонии или некоторого другого легочного или другого острого проявления COVID-19, такого как тромбоз, у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2, включающий:

(i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с образцом здорового контрольного субъекта указывает на повышенный риск развития одного или больше острых проявлений COVID-19; и

(ii) введение субъекту, имеющему повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH, количества MASP-2-ингибирующего средства, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, где, необязательно, количество указанного MASP-2-ингибирующего средства является достаточным для снижения уровня MASP-2/C1-INH до контрольного уровня или референсного стандарта.

2. Способ по п.1, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой антитело к MASP-2 или его фрагмент.

3. Способ по п.2, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6.

4. Способ по п.2, где антитело к MASP-2 или его фрагмент специфично связываются с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью по меньшей мере в 10 раз больше, чем аффинность, с которой они связываются с другим антигеном в системе комплемента.

5. Способ по п.2, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

6. Способ по п.1, где MASP-2-ингибирующее средство селективно ингибирует активацию комплемента по лектиновому пути, по существу не ингибируя C1q-зависимую активацию комплемента.

7. Способ по п.1, где MASP-2-ингибирующее средство является низкомолекулярным MASP-2-ингибирующим соединением.

8. Способ по п.7, где MASP-2-ингибирующее соединение представляет собой синтетическую или полусинтетическую малую молекулу.

9. Способ по п.1, где MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором экспрессии MASP-2.

10. Способ по п.1, где MASP-2-ингибирующее средство вводят подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутриартериально, внутривенно, перорально или в виде ингаляционного средства.

11. Способ по п.2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69.

12. Способ по п.2, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO:69.

13. Способ лечения, облегчения, предотвращения или снижения риска развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, у субъекта-млекопитающего, инфицированного SARS-CoV-2, включающий:

(i) определение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта, где повышенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH по сравнению с контрольным образцом здорового субъекта указывает на повышенный риск развития одного или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19; и

(ii) введение субъекту, имеющему увеличенный уровень комплекса MASP-2/C1-INH, количества ингибитора MASP-2, эффективного для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

14. Способ по п.13, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой антитело к MASP-2 или его фрагмент.

15. Способ по п.14, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой моноклональное антитело к MASP-2 или его фрагмент, которые специфично связываются с частью SEQ ID NO:6.

16. Способ по п.14, где антитело к MASP-2 или его фрагмент специфично связываются с полипептидом, включающим SEQ ID NO:6, с аффинностью по меньшей мере в 10 раз больше, чем аффинность, с которой они связываются с другим антигеном в системе комплемента.

17. Способ по п.14, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

18. Способ по п.14, где MASP-2-ингибирующее средство селективно ингибирует активацию комплемента по лектиновому пути по существу без ингибирования C1q-зависимой активации комплемента.

19. Способ по п.13, где MASP-2-ингибирующее средство представляет собой низкомолекулярное MASP-2-ингибирующее соединение.

20. Способ по п.13, где MASP-2-ингибирующее соединение представляет собой синтетическую или полусинтетическую малую молекулу.

21. Способ по п.13, где MASP-2-ингибирующее средство является ингибитором

экспрессии MASP-2.

22. Способ по п.14, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:69.

23. Способ по п.14, где MASP-2-ингибирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO:67, и вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO:69.

24. Способ по п.13, где одно или больше долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, выбраны из группы, состоящей из сердечно-сосудистого осложнения (включая повреждение миокарда, кардиомиопатию, миокардит, внутрисосудистое свертывание крови, инсульт, венозные и артериальные осложнения и легочный тромбоз); неврологического осложнения (включая когнитивные затруднения, спутанность сознания, потерю памяти, также называемую "затуманенным сознанием", головную боль, инсульт, головокружение, обмороки, судороги, анорексию, бессонницу, аносмию, агевзию, миоклонус, нейропатическую боль, миалгии, развитие неврологического заболевания, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Гийена-Барре, синдром Миллера-Фишера, болезнь Паркинсона); повреждения почек (например, острой почечной недостаточности (ОПН); легочного осложнения (включая фиброз легких, одышку, легочную тромбоэмболию), воспалительного состояния, такого как синдром Кавасаки, Кавасаки-подобный синдром, мультисистемный воспалительный синдром у детей, полиорганная недостаточность, крайняя утомляемость, мышечная слабость, субфебрильная температура, невозможность концентрации внимания, провалы в памяти, изменения настроения, нарушения сна, покалывания в руках и ногах, диарея и рвота, потеря вкуса и обоняния, боль в горле и затрудненное глотание, первичное возникновение диабета и гипертензии, кожная сыпь, одышка, боли в груди и учащенное сердцебиение.

25. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с MASP-2 человека в комплексе с C1-INH, где антитело включает связывающий домен, включающий: (a) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98,

где CDR пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата.

26. Моноклональное антитело по п.25, где указанное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью

с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:87, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:88; или где указанное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO:98.

27. Моноклональное антитело по п.25, где указанное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или полностью человеческое антитело.

28. Способ измерения количества MASP-2/C1-INH в биологическом образце, включающий:

(a) получение исследуемого биологического образца у субъекта-человека;

(b) проведение иммуноанализа, включающего захват и обнаружение комплекса MASP-2/C1-INH в исследуемом образце, где MASP-2/C1-INH захватывается моноклональным антителом, которое специфично связывается с MASP-2 человека; и комплекс MASP-2/C1-INH детектируется напрямую или ненапрямую с помощью антитела, которое специфично связывается с C1-INH; и

(c) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, детектированного в соответствии с (b), с заданным уровнем или контрольным образцом, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH, обнаруженный в исследуемом образце, указывает на степень активации комплемента по лектиновому пути.

29. Способ по п.28, где биологический образец представляет собой образец жидкости, выбранный из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мочи и спинномозговой жидкости.

30. Способ по п. 28, где антитело, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий (a) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO: 87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, или (b) HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR пронумерованы согласно системе нумерации Кэбата.

31. Способ по п. 28, где субъект-человек в настоящее время инфицирован SARS-CoV-2 или был ранее инфицирован SARS-CoV-2, или где субъект страдает или подвергается риску развития другого ассоциированного с лектиновым путем заболевания или состояния (например, ТГСК-ТМА, IgAN, GvHD или другого заболевания или нарушения лектинового пути).

32. Способ определения риска развития у субъекта, который инфицирован или был инфицирован SARS-CoV-2, ОРДС, связанного с COVID-19, или другого

неблагоприятного исхода, или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, включающий:

(a) получение биологического образца у субъекта;

(b) измерение уровня комплекса MASP-2/C1-INH в образце;

(c) сравнение измеренного уровня с заданным уровнем комплекса MASP-2/C1-INH или референсным стандартом для оценки риска развития ОРДС, связанного с COVID-19, и/или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19; и

(d) определение риска развития у субъекта ОРДС, связанного с COVID-19, или другого неблагоприятного исхода и/или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19, и предоставление результатов пациенту, врачу или в базу данных;

(e) необязательно, назначение лечения субъекту, у которого определена высокая вероятность развития острого заболевания и/или долгосрочных последствий, связанных с инфекцией COVID-19.

33. Способ по п.32, где уровень комплекса MASP-2/C1-INH измеряют в иммуноанализе.

34. Способ по п.32, включающий проведение иммуноанализа для измерения уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце.

35. Способ по п.34, где иммуноанализ представляет собой анализ ИФА.

36. Способ по п.35, где иммуноанализ включает применение захватывающего антитела, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:87, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:88, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

37. Способ по п.34, где иммуноанализ представляет собой иммунофлуоресцентный анализ на основе гранул.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что иммуноанализ включает применение захватывающего антитела, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

39. Способ по п.37 или п.38, где биологический образец представляет собой сыворотку или плазму крови.

40. Способ по п.39, где биологический образец представляет собой 1-5% сыворотку или плазму крови.

41. Способ мониторинга эффективности лечения MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего, включающий:

(a) введение дозы MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента субъекту-млекопитающему в первый момент времени;

(b) оценку первого уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (a);

(c) лечение субъекта MASP-2-ингибирующим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом во второй момент времени;

(d) оценку второго уровня комплекса MASP-2/C1-INH в биологическом образце, полученном у субъекта после этапа (c); и

(e) сравнение уровня комплекса MASP-2/C1-INH, определенного на этапе (b), с уровнем комплекса MASP-2/C1-INH, определенным на этапе (d), для определения эффективности MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта-млекопитающего.

42. Способ по п.41, где способ дополнительно включает коррекцию дозы MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

43. Способ по п.42, где дозу MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимого субъекту, повышают, если уровень комплекса MASP-2/C1-INH выше контрольного или референсного стандарта.

44. Способ по п.43, где в случае, если субъекту вводят повышенную дозу MASP-2-ингибирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, этапы (b)-(e) повторяют с целью определения, является ли повышенная доза достаточной для доведения уровня комплекса MASP-2/C1-INH до нужного уровня по сравнению с соответствующим контрольным или референсным стандартом.

45. Способ по п.41, где этапы (b) и (d) включают оценку концентрации комплекса MASP-2/CI-INH в биологических образцах в иммуноанализе.

46. Способ по п.45, где иммуноанализ представляет собой иммунофлуоресцентный анализ на основе гранул.

47. Способ по п.46, где иммуноанализ включает применение захватывающего антитела, которое специфично связывается с MASP-2, включает связывающий домен, включающий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, представленной как SEQ ID NO:97, и включающий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в вариабельной области легкой цепи, представленной как SEQ ID NO:98, где CDR-области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Кэбата.

48. Способ по п.46 или 47, где биологический образец представляет собой сыворотку или плазму крови.

49. Способ по п.48, где биологический образец представляет собой 1-5% сыворотку или плазму крови.

50. Способ по любому из пп. 41-50, где субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-человека.

51. Способ по п. 50, где субъект-человек страдает или подвергается риску развития ассоциированного с лектиновым путем заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из ТГСК-ТМА, IgAN, волчаночного нефрита и реакции трансплантат

против хозяина или некоторого другого ассоциированного с лектиновым путем заболевания или нарушения.

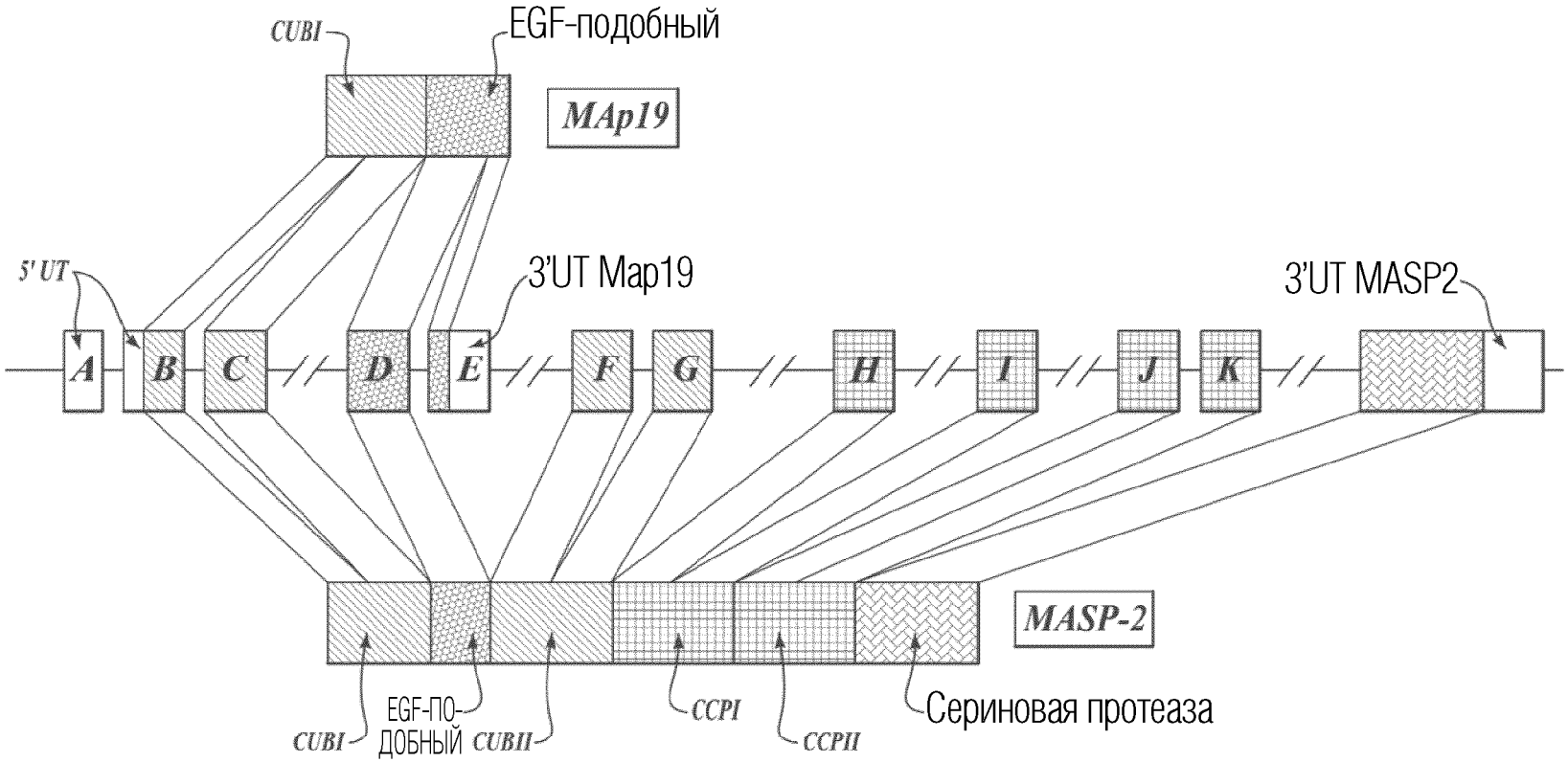
52. Способ по п.41, где субъект-человек страдает или подвергается риску развития COVID-19 или долгосрочных последствий, связанных с COVID-19.

53. Способ по п.41, где второй момент времени наступает от 2 до 14 дней после первого момента времени.

54. Способ по п.41, где второй момент времени наступает в пределах от 2 до 7 дней после первого момента времени.

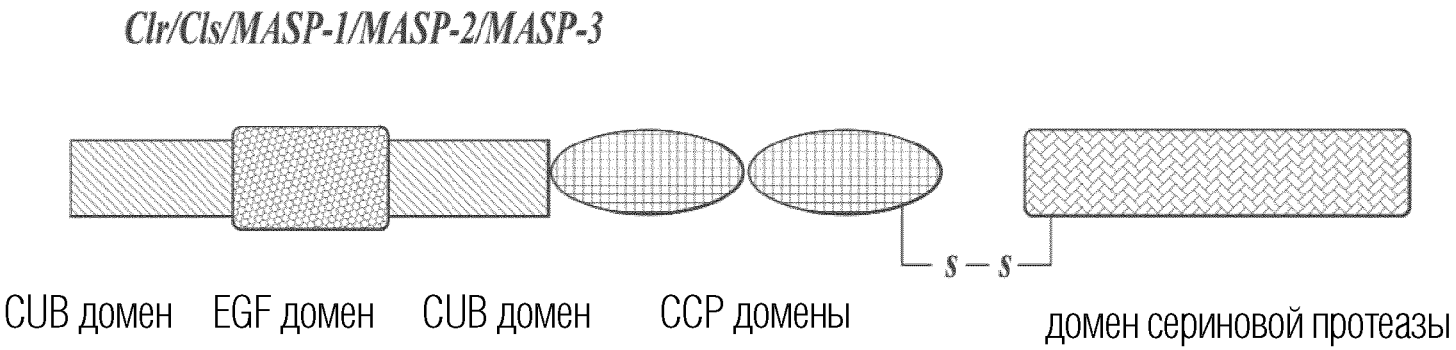
55. Способ по п.41, где второй момент времени наступает в пределах от 2 до 4 дней после первого момента времени.

По доверенности

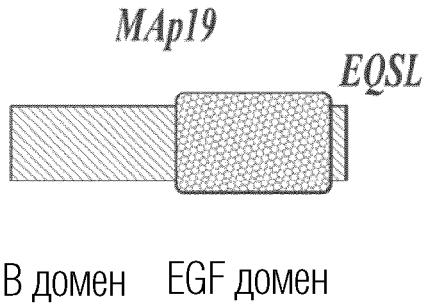

CUBI
EGF-подобный
MAp19
5' UT
3'UT Map19
3'UT MASP2
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
MASP-2
CUBI
EGF-ПО-
ДОБНЫЙ
CUBII
CCPI
CCPII
Сериновая протеаза

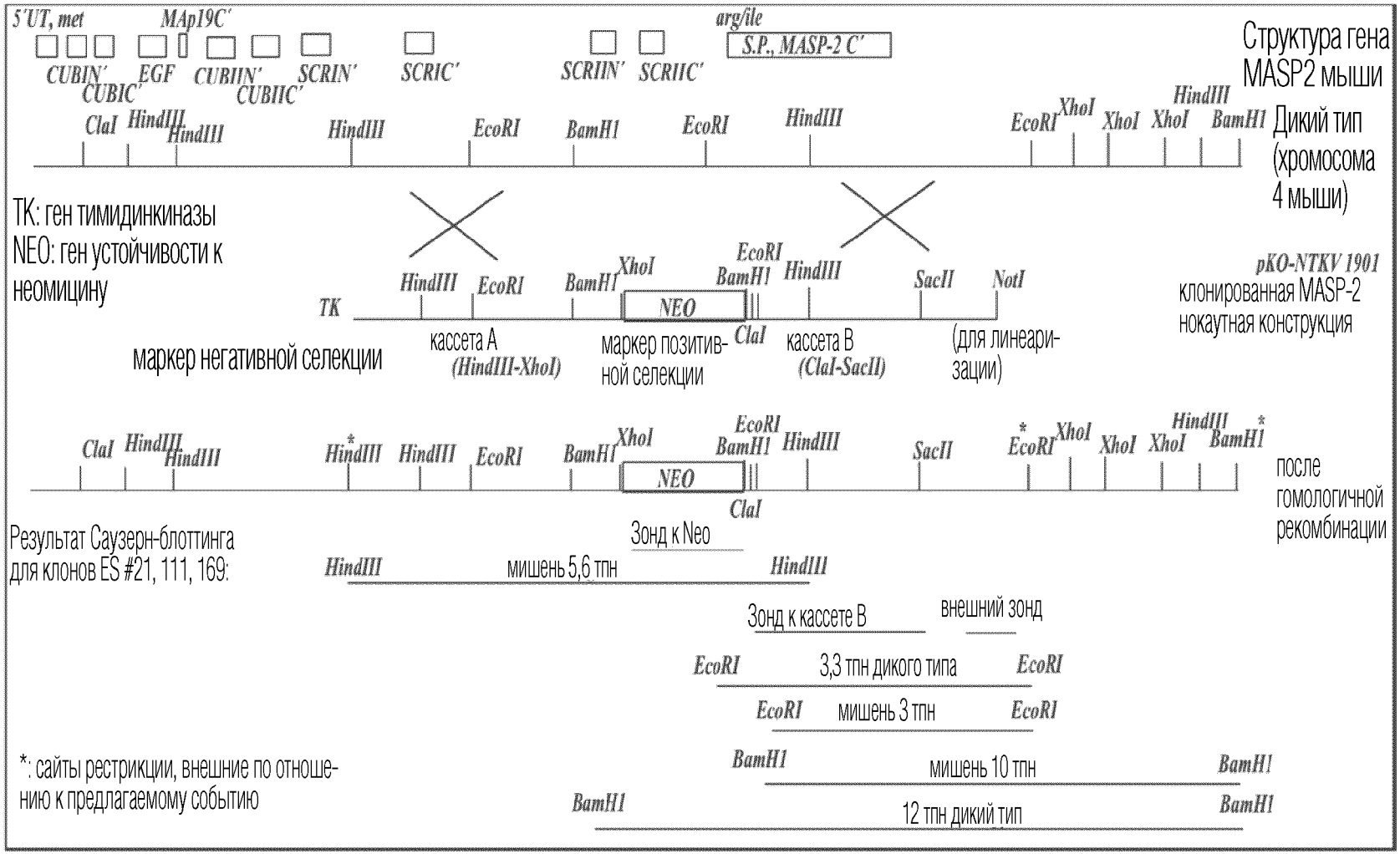
ФИГ. 1

ФИГ. 2A

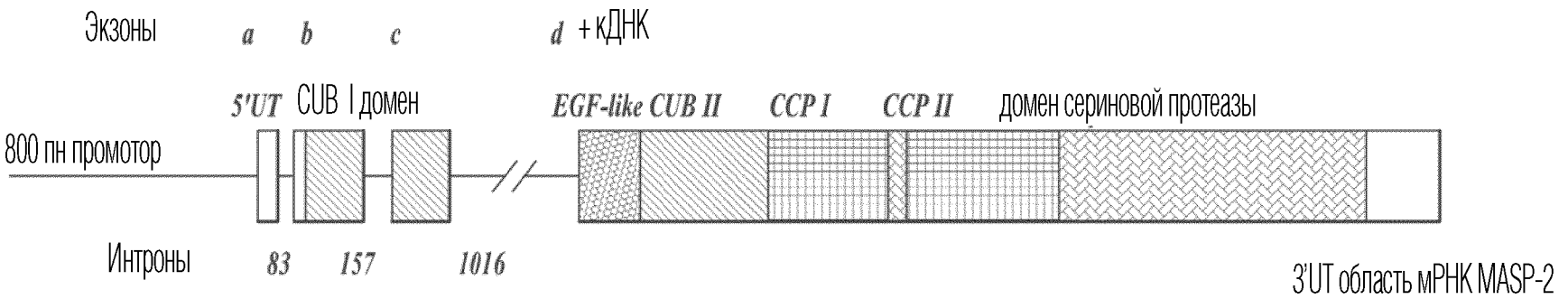

Clr/Cls/MASP-1/MASP-2/MASP-3
s — s
CUB домен
EGF домен
CUB домен
CCP домены
домен сериновой протеазы

ФИГ. 2B

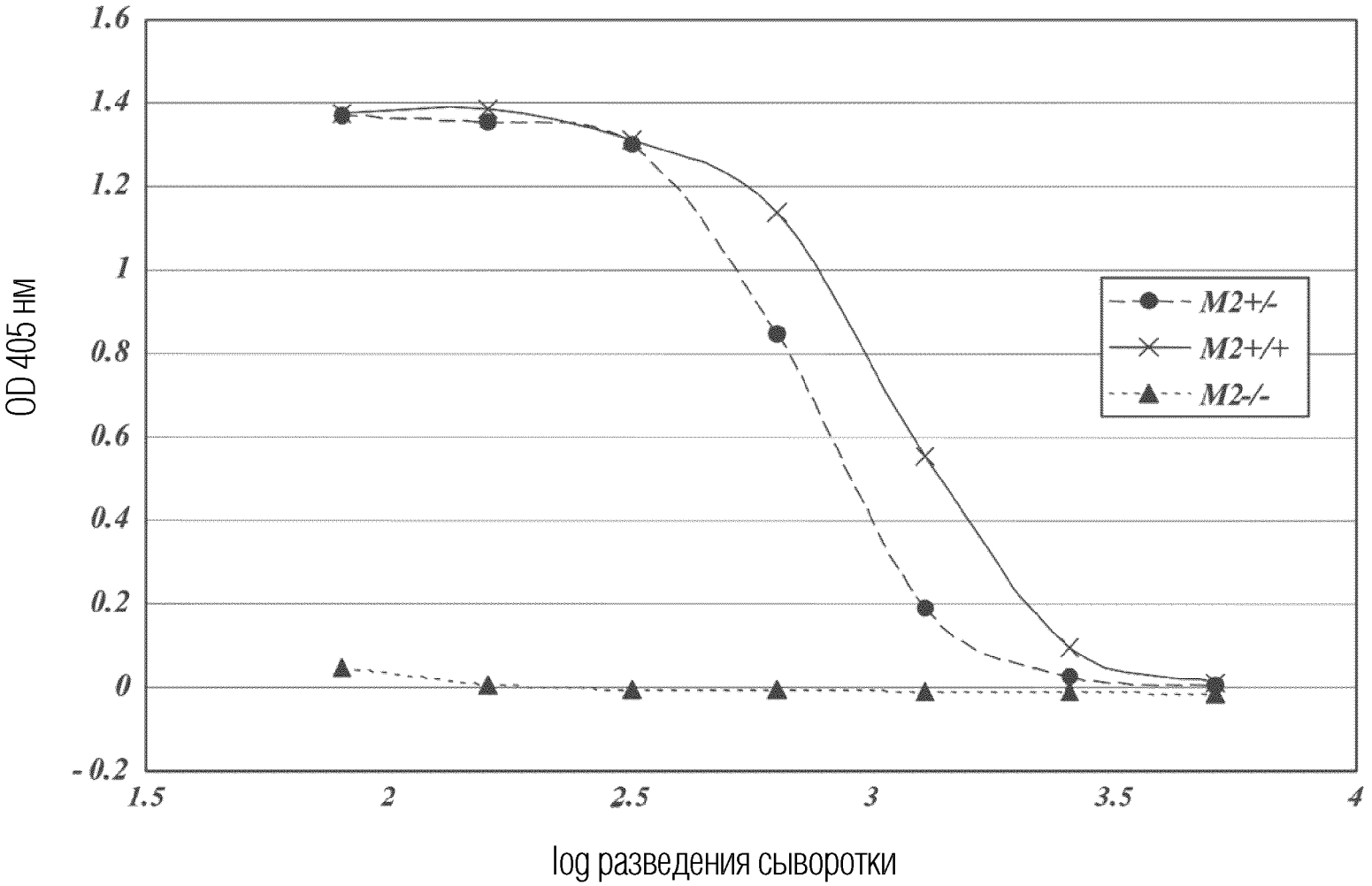

MAp19
EQSL
CUB домен
EGF домен


5'UT, met
MAp19C'
arg/ile
CUBIN'
CUBIC'
EGF
CUBIIN'
CUBIIC'
SCRIN'
SCRIC'
SCRIIN'
SCRIIC'
S.P., MASP-2 C'
Структура гена MASP2 мыши
ClaI
HindIII
HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
EcoRI
HindIII
EcoRI
XhoI
XhoI
XhoI
HindIII
BamH1
Дикий тип (хромосома 4 мыши)
TK: ген тимидинкиназы
NEO: ген устойчивости к неомицину
TK
HindIII
EcoRI
BamH1
XhoI
NEO
EcoRI
BamH1
HindIII
SacII
NotI
ClaI
pKO-NTKV 1901
клонированная MASP-2 нокаутная конструкция
маркер негативной селекции
кассета A
(HindIII-XhoI)
маркер позитивной селекции
кассета B
(ClaI-SacII)
(для линеаризации)
ClaI
HindIII
HindIII
*HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
XhoI
NEO
ClaI
EcoRI
BamH1
HindIII
SacII
*EcoRI
XhoI
XhoI
XhoI
HindIII
BamH1*
после гомологичной рекомбинации
Результат Саузерн-блоттинга для клонов ES #21, 111, 169:
Зонд к Neo
HindIII
мишень 5,6 тпн
HindIII
Зонд к кассете B
внешний зонд
EcoRI
3,3 тпн дикого типа
EcoRI
EcoRI
мишень 3 тпн
EcoRI
*: сайты рестрикции, внешние по отношению к предлагаемому событию
BamH1
мишень 10 тпн
BamH1
BamH1
12 тпн дикий тип
BamH1

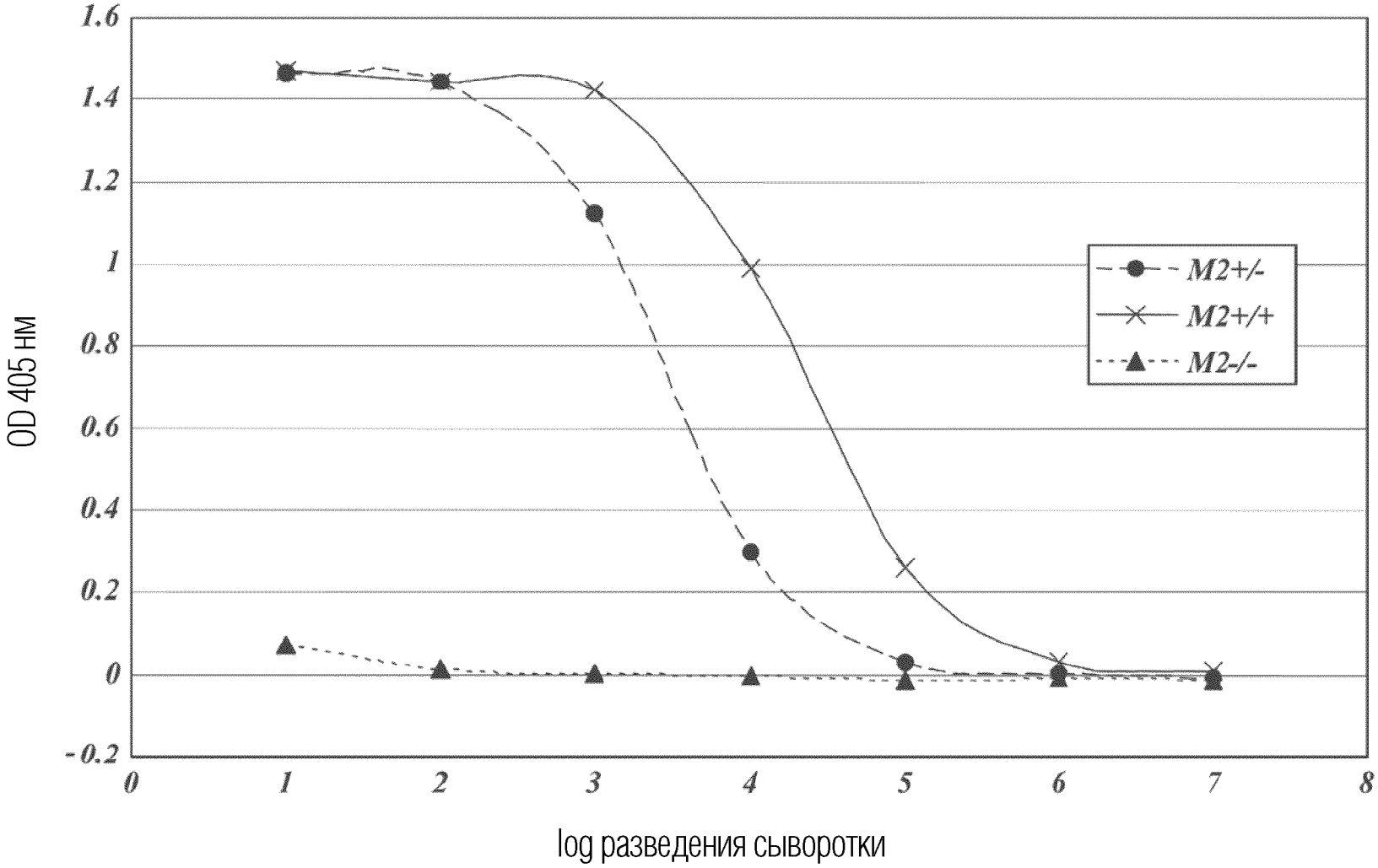
ФИГ. 3


Экзоны
a
b
c
d
+ кДНК
5'UT
CUB I домен
EGF-like CUB II
CCP I
CCP II
домен сериновой протеазы
800 пн промотор
Интроны
83
157
1016
3'UT область мРНК MASP-2

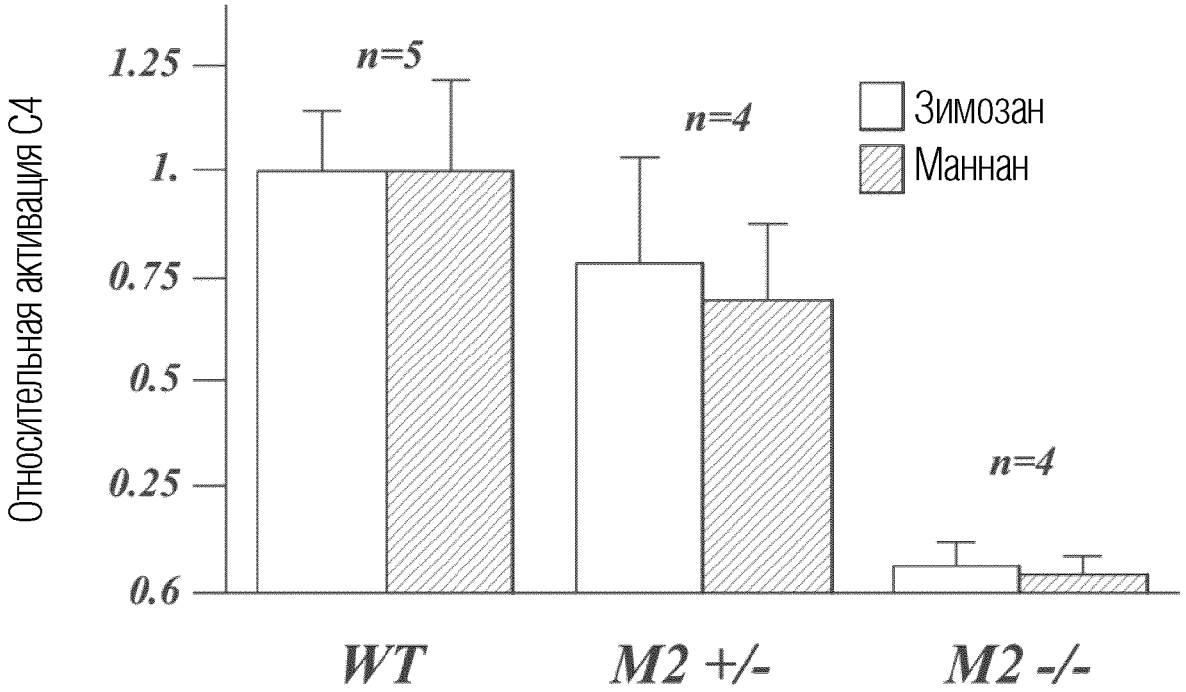
ФИГ. 4


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
- 0.2
OD 405 нм
1.5
2
2.5
3
3.5
4
log разведения сыворотки
M2+/-
M2+/+
M2-/-

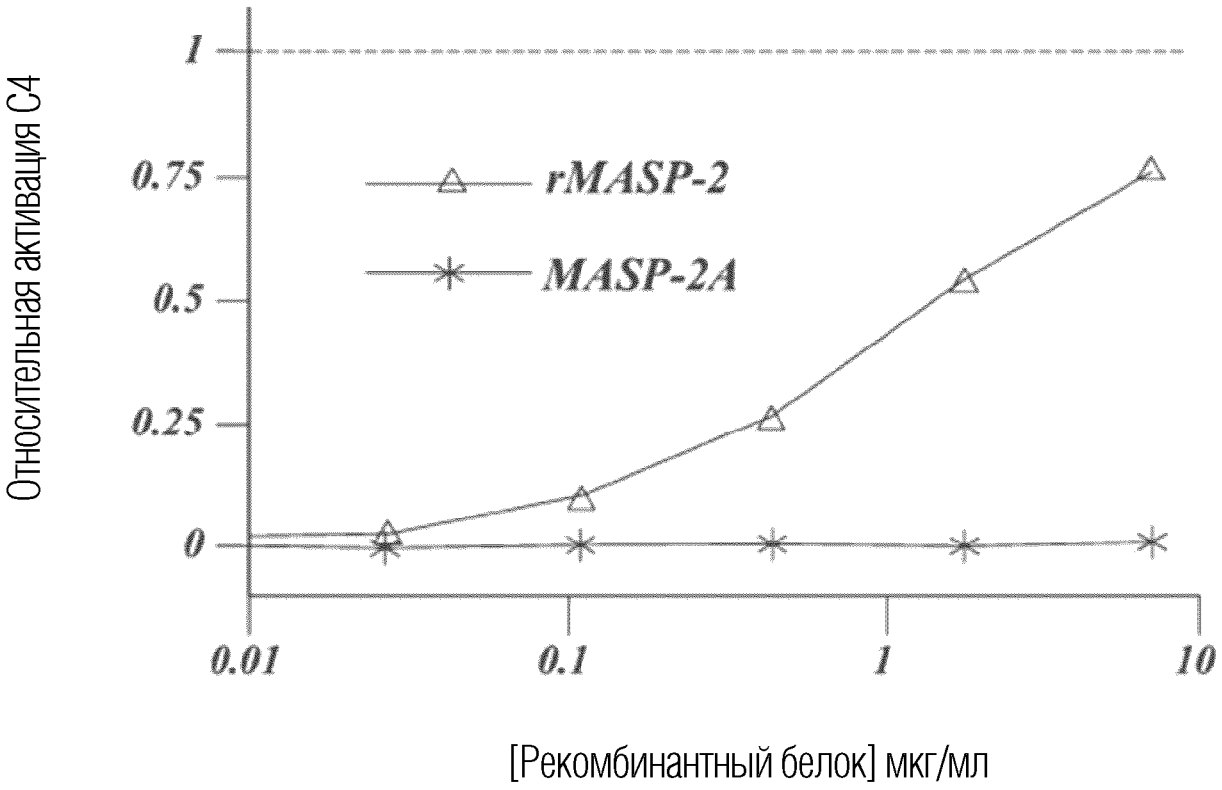
ФИГ. 5А


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
OD 405 нм
log разведения сыворотки
M2+/-
M2+/+
M2-/-

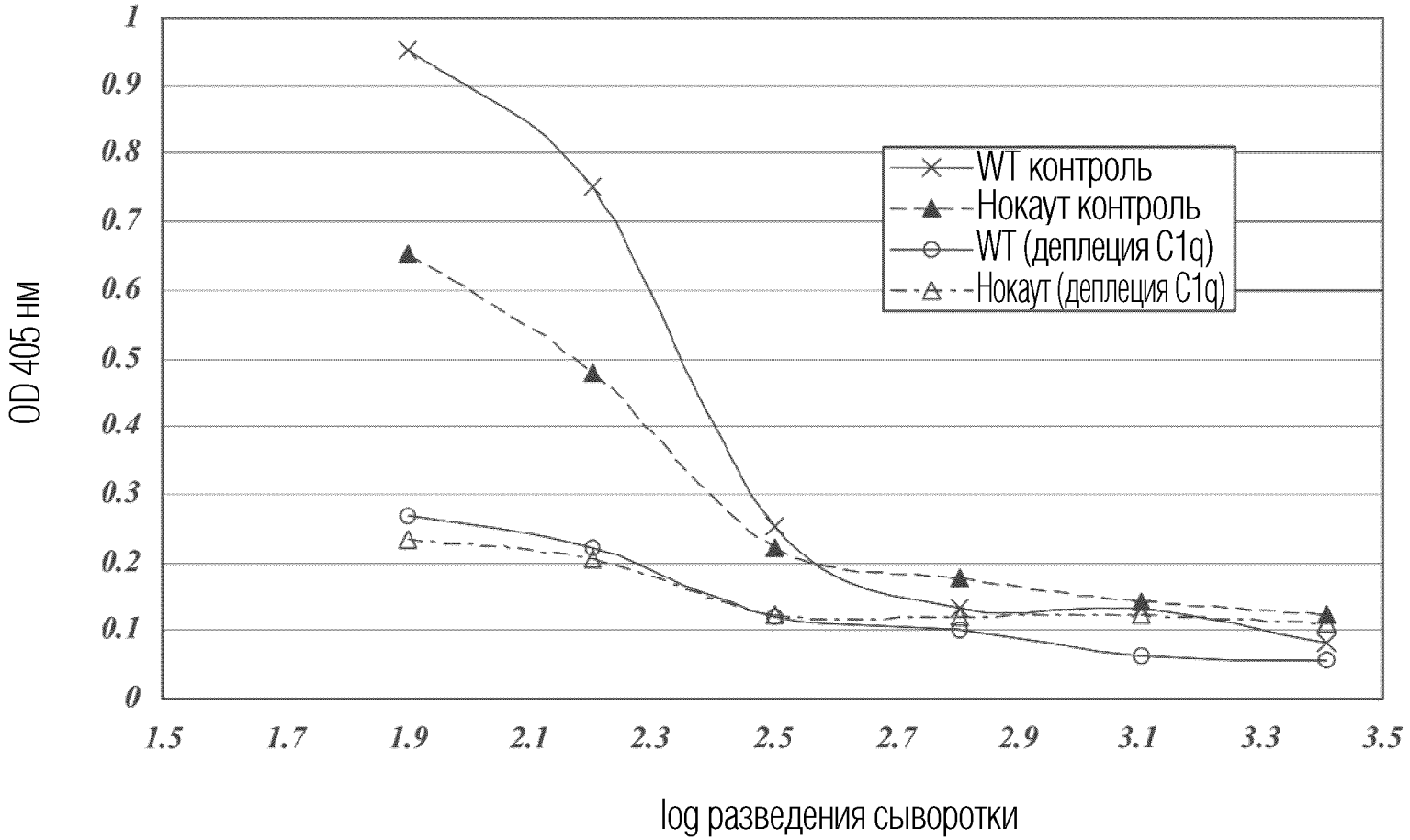
ФИГ. 5B


Относительная активация C4
1.25
1.
0.75
0.5
0.25
0.6
n=5
n=4
n=4
Зимозан
Маннан
WT
M2 +/-
M2 -/-

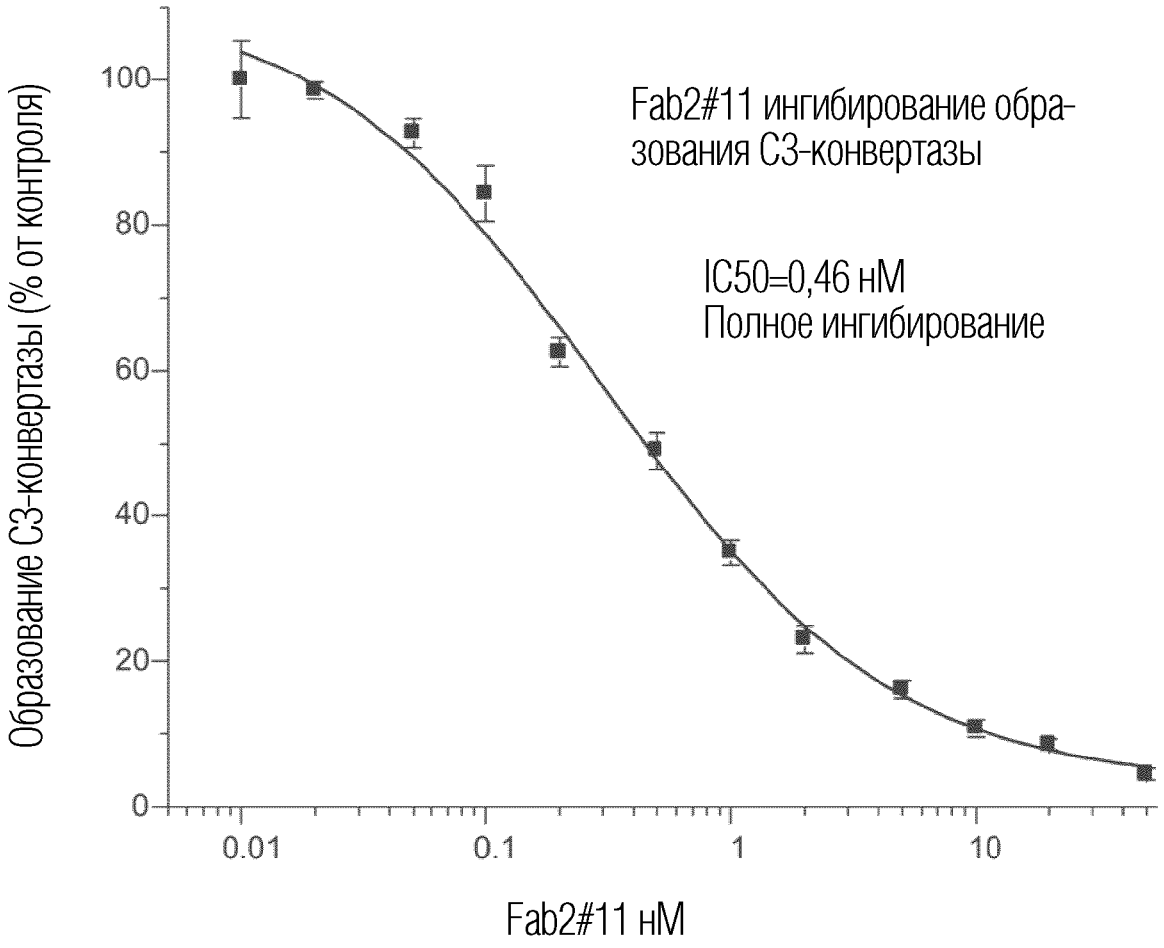
ФИГ. 5C


Относительная активация C4
1
0.75
0.5
0.25
0
rMASP-2
MASP-2A
0.01
0.1
1
10
[Рекомбинантный белок] мкг/мл

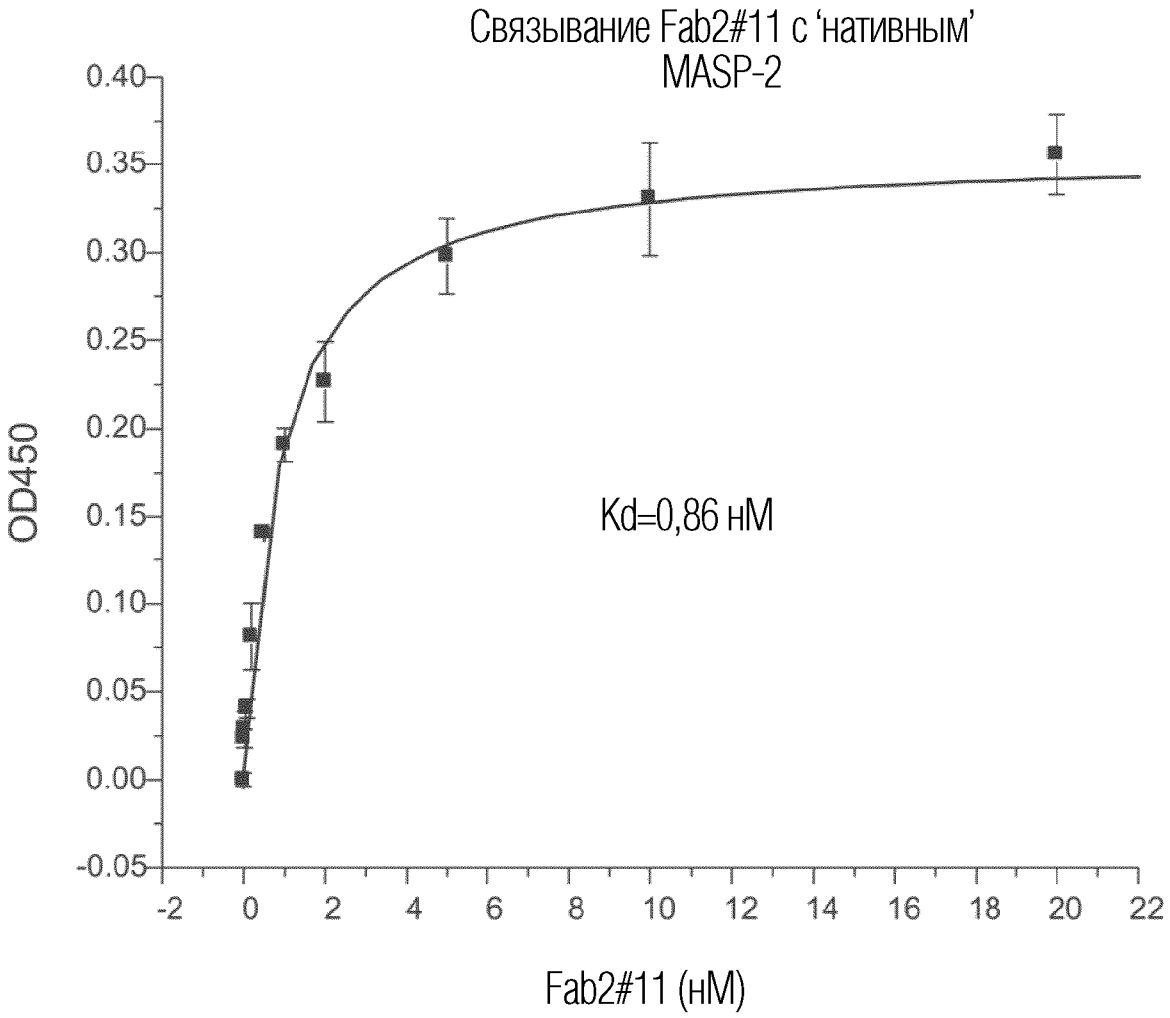
ФИГ. 6


OD 405 нм
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1.5
1.7
1.9
2.1
2.3
2.5
2.7
2.9
3.1
3.3
3.5
log разведения сыворотки
WT контроль
Нокаут контроль
WT (деплеция C1q)
Нокаут (деплеция C1q)

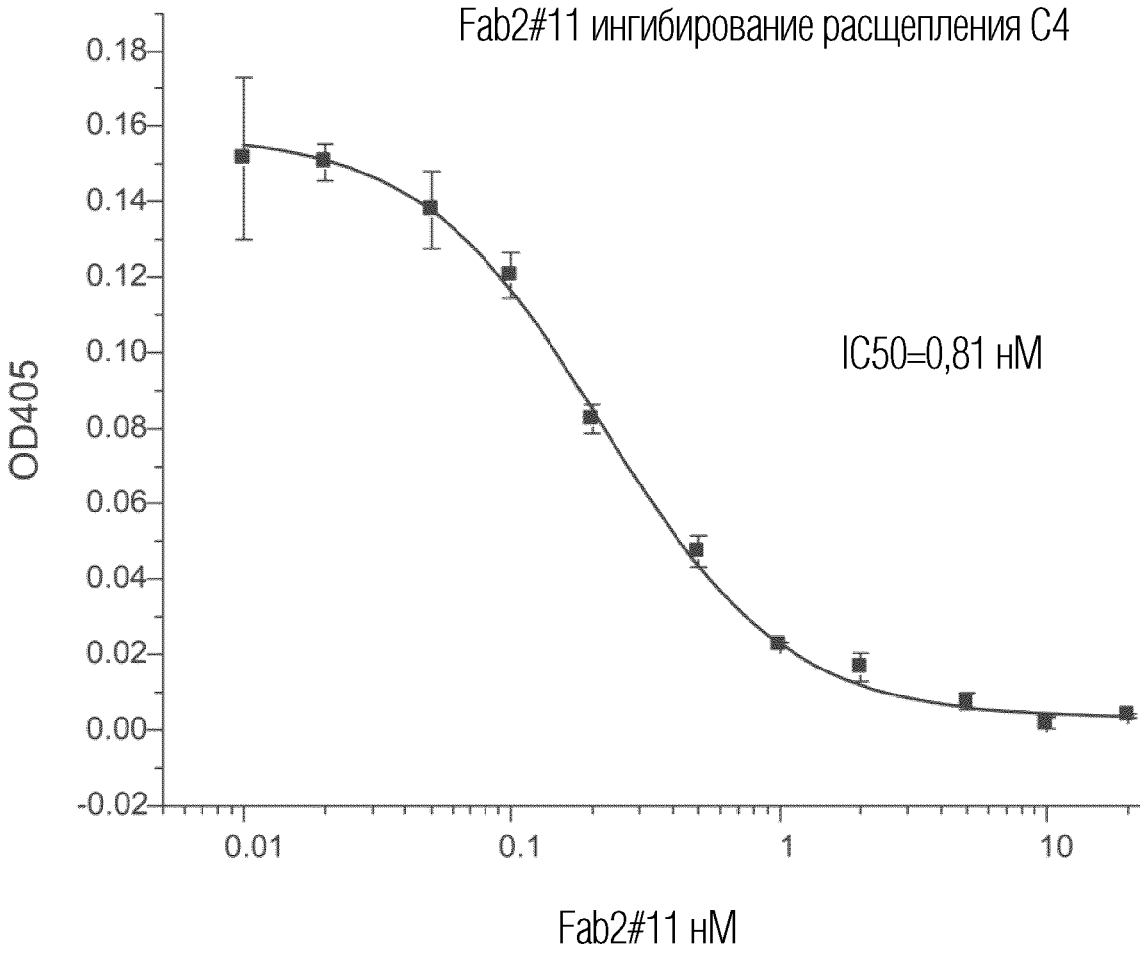
ФИГ. 7


Образование С3-конвертазы (% от контроля)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Fab2#11 нМ
Fab2#11 ингибирование образования С3-конвертазы
IC50=0,46 нМ
Полное ингибирование

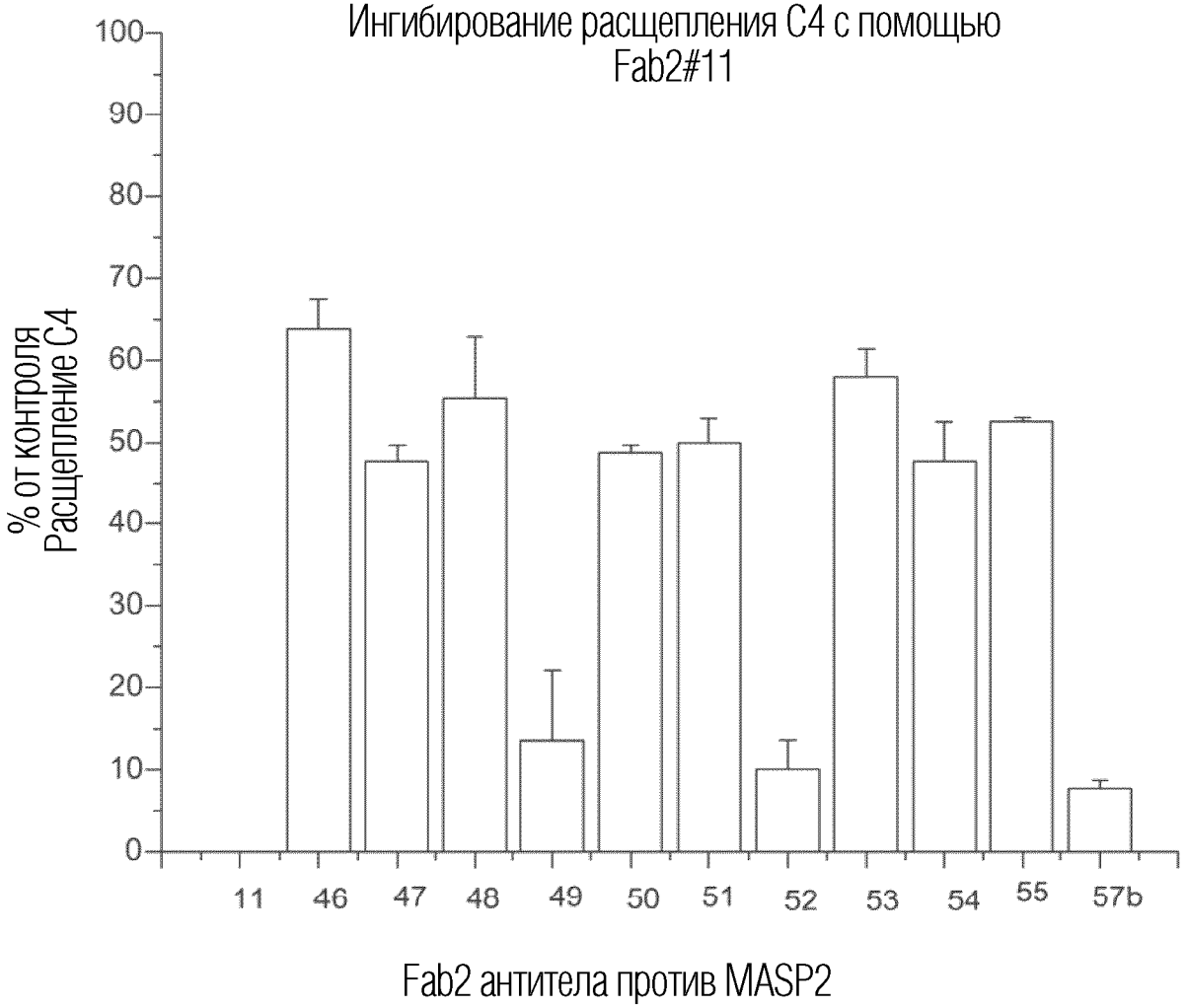
ФИГ. 8А


Связывание Fab2#11 с 'нативным'
MASP-2
OD450
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Kd=0,86 нМ
Fab2#11 (нМ)

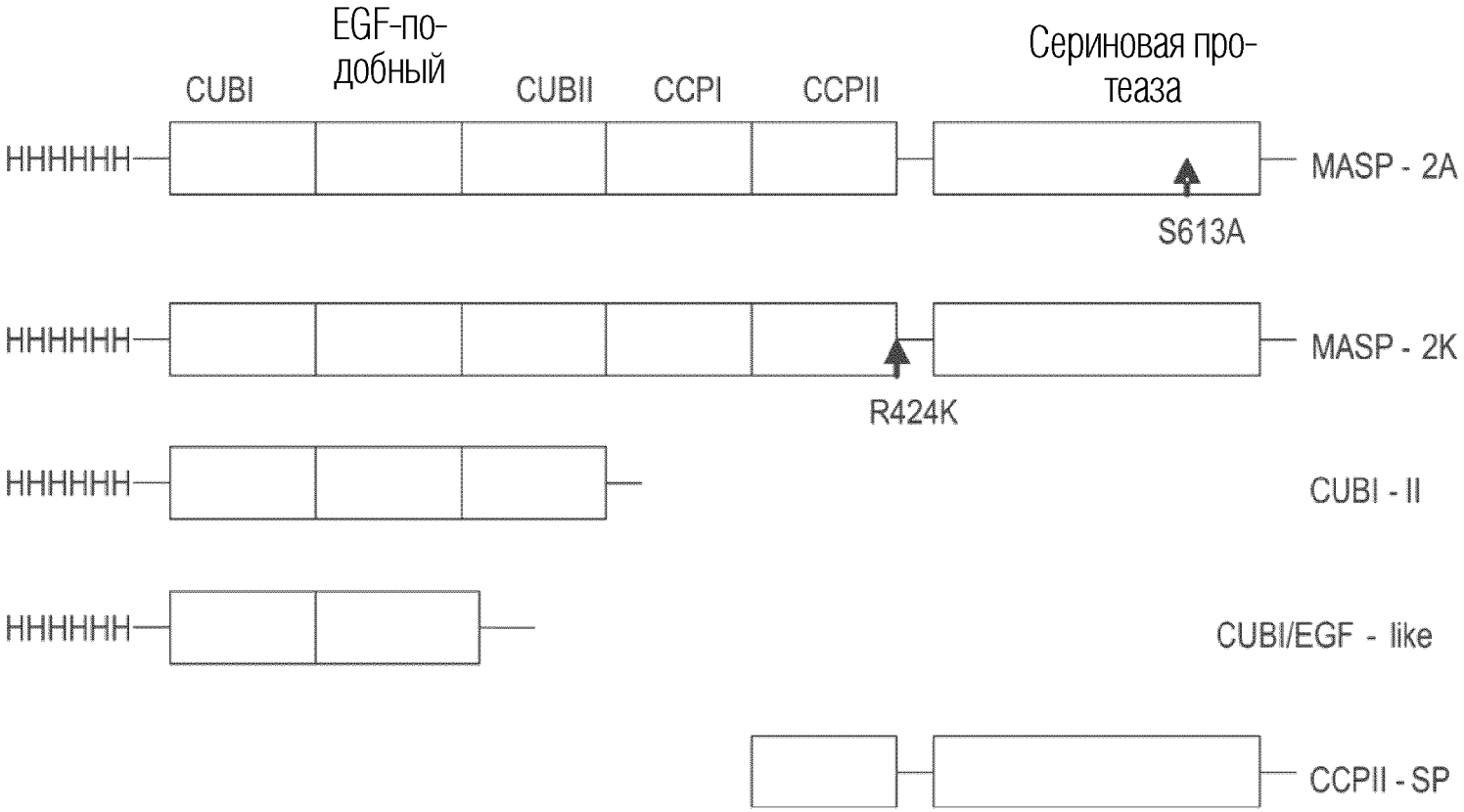
ФИГ. 8В


Fab2#11 ингибирование расщепления C4
IC50=0,81 нМ
OD405
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
0.01
0.1
1
10
Fab2#11 нМ

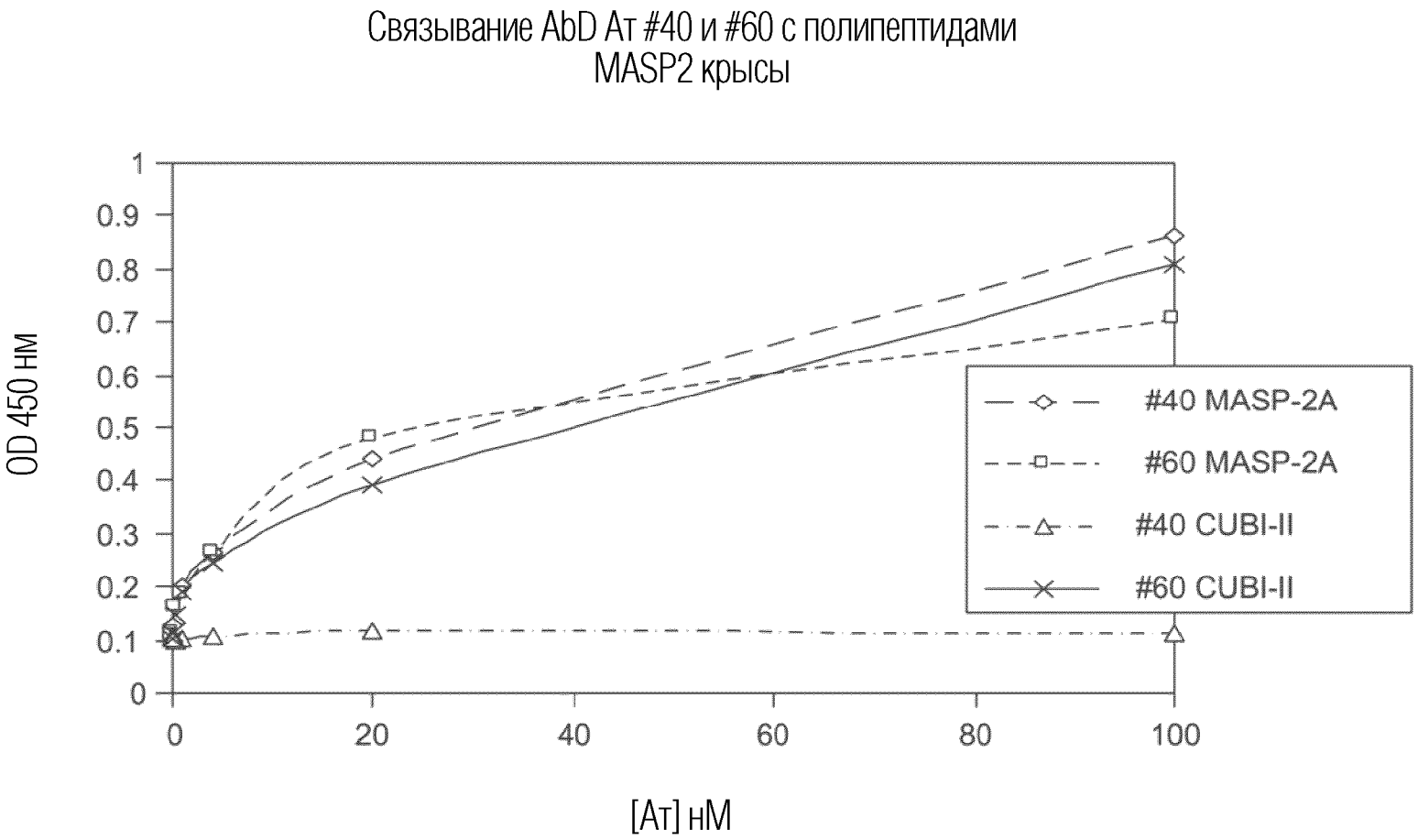
ФИГ. 8C


Ингибирование расщепления C4 с помощью Fab2#11
% от контроля Расщепление C4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
Fab2 антитела против MASP2

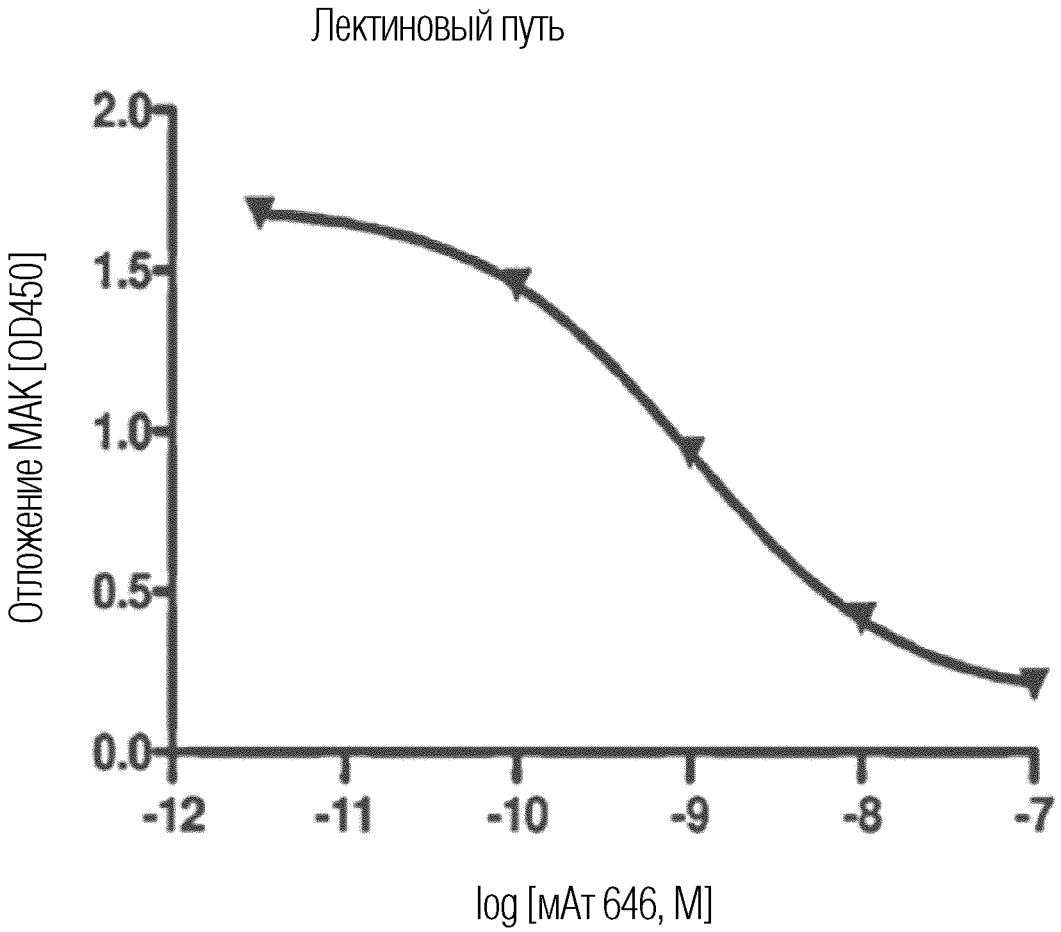
ФИГ. 9


EGF-по-
добный
Сериновая про-
теаза
CUBI
CUBII
CCPI
CCPII
HHHHHH
MASP - 2A
S613A
HHHHHH
MASP - 2K
R424K
HHHHHH
CUBI - II
HHHHHH
CUBI/EGF - like
CCPII - SP

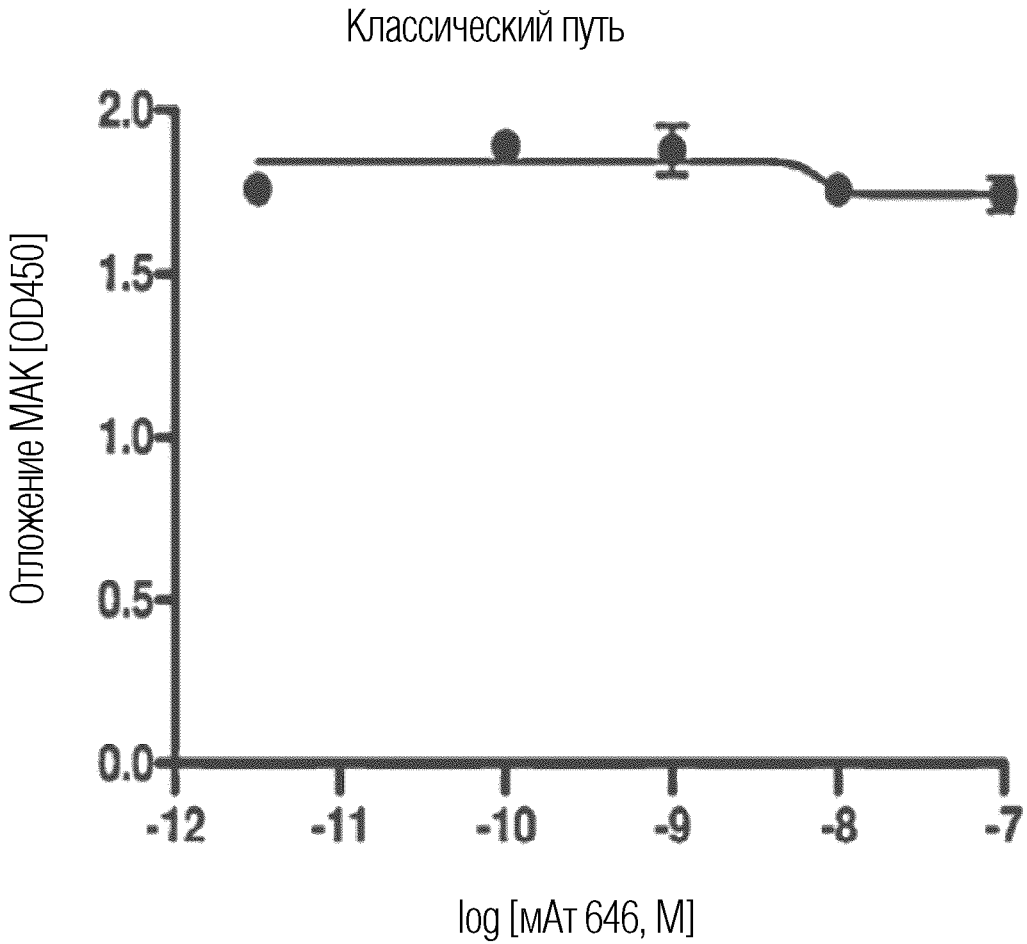
ФИГ. 10


Связывание AbD Ат #40 и #60 с полипептидами MASP2 крысы
OD 450 нм
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
[Ат] нМ
#40 MASP-2A
#60 MASP-2A
#40 CUBI-II
#60 CUBI-II

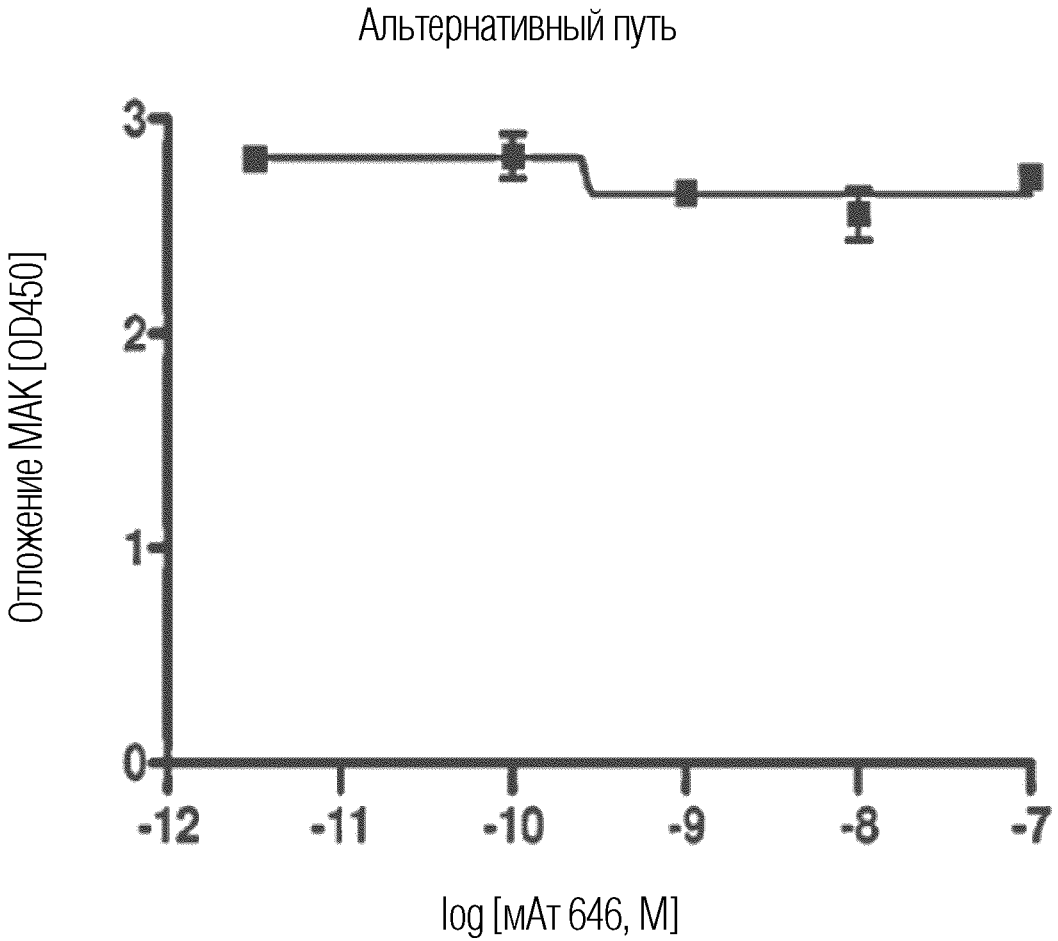
ФИГ. 11


Лектиновый путь
Отложение МАК [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, М]

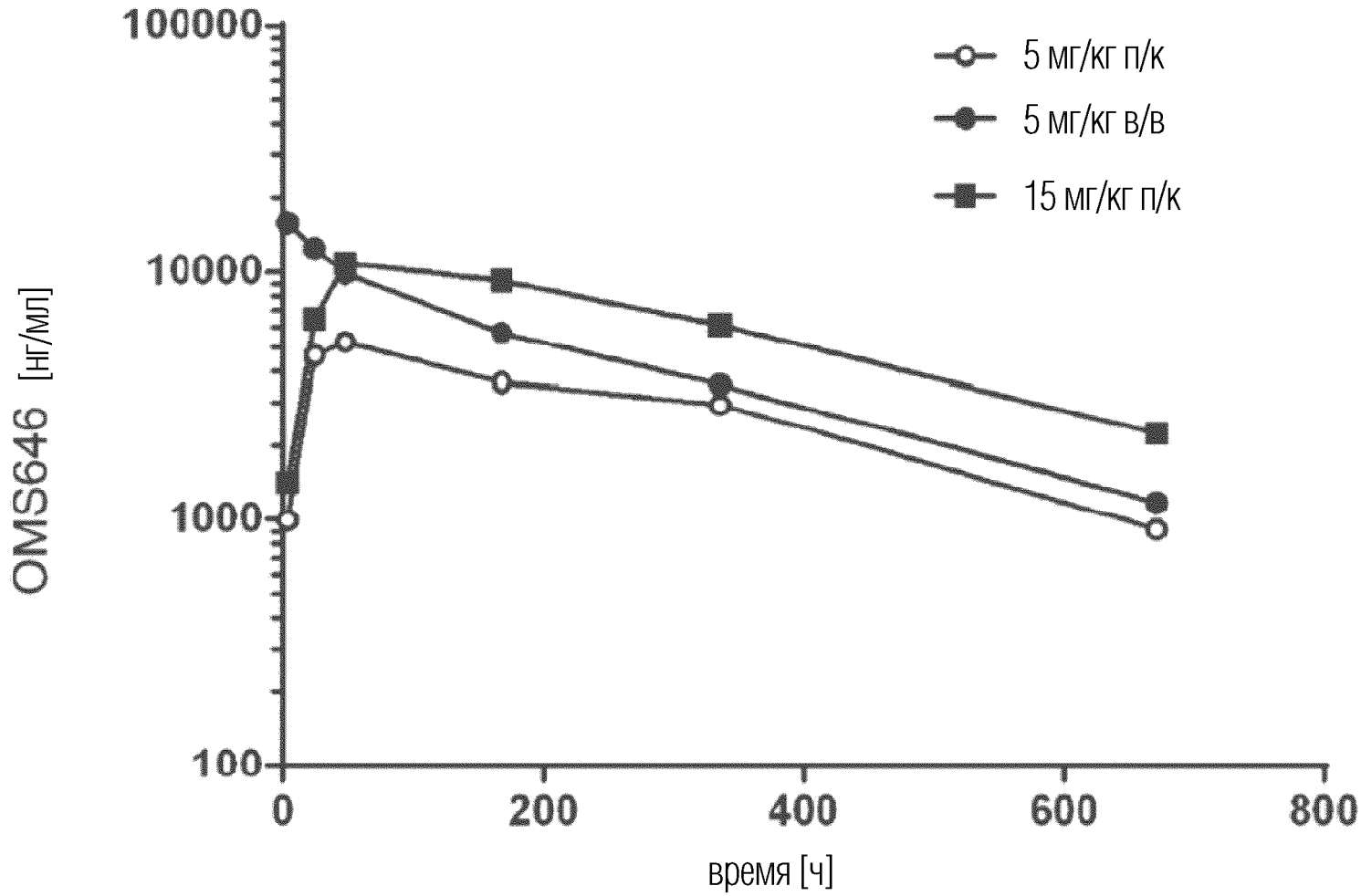
ФИГ. 12А


Классический путь
Отложение МАК [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, М]

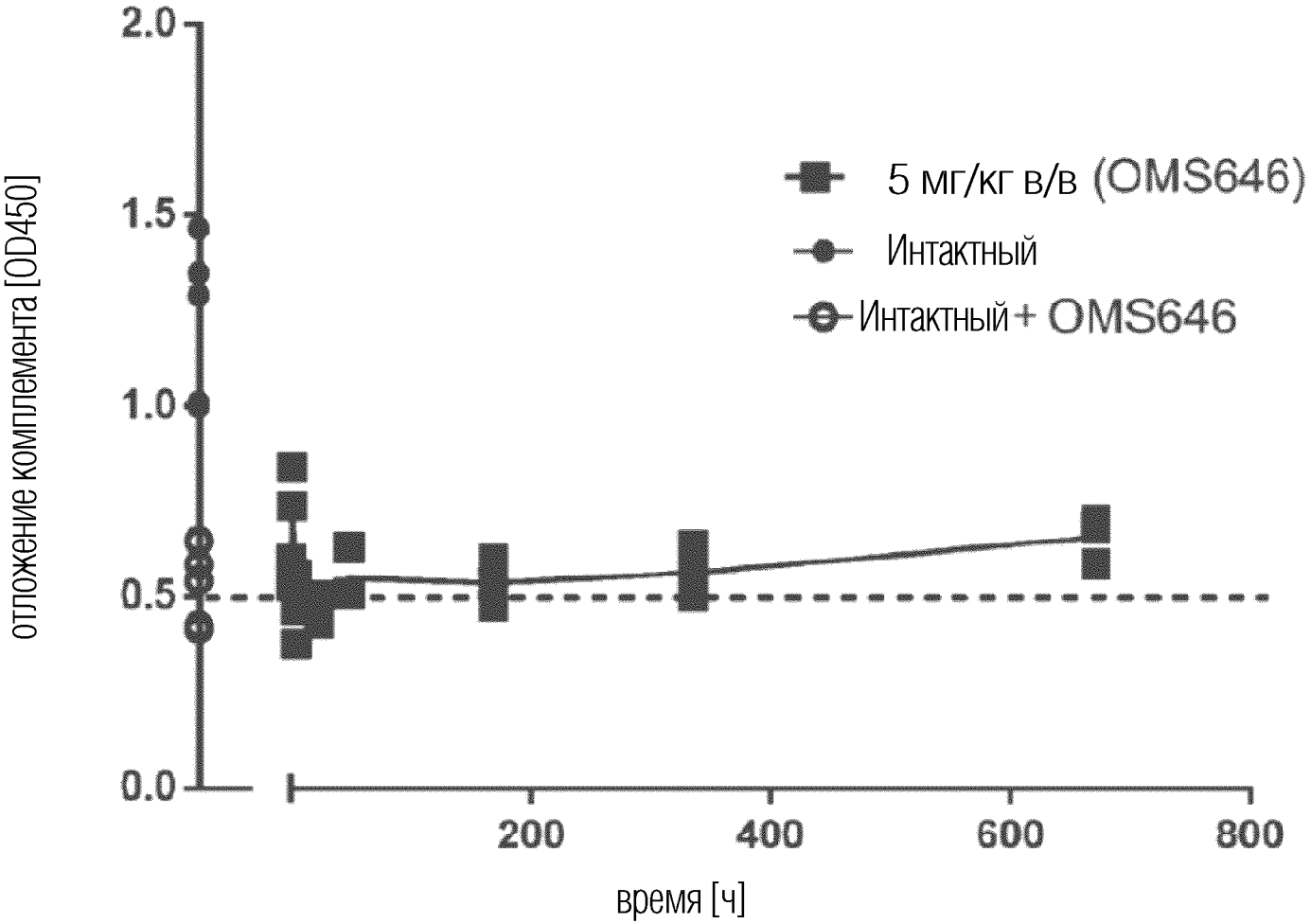
ФИГ. 12В


Альтернативный путь
Отложение МАК [OD450]
3
2
1
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, М]

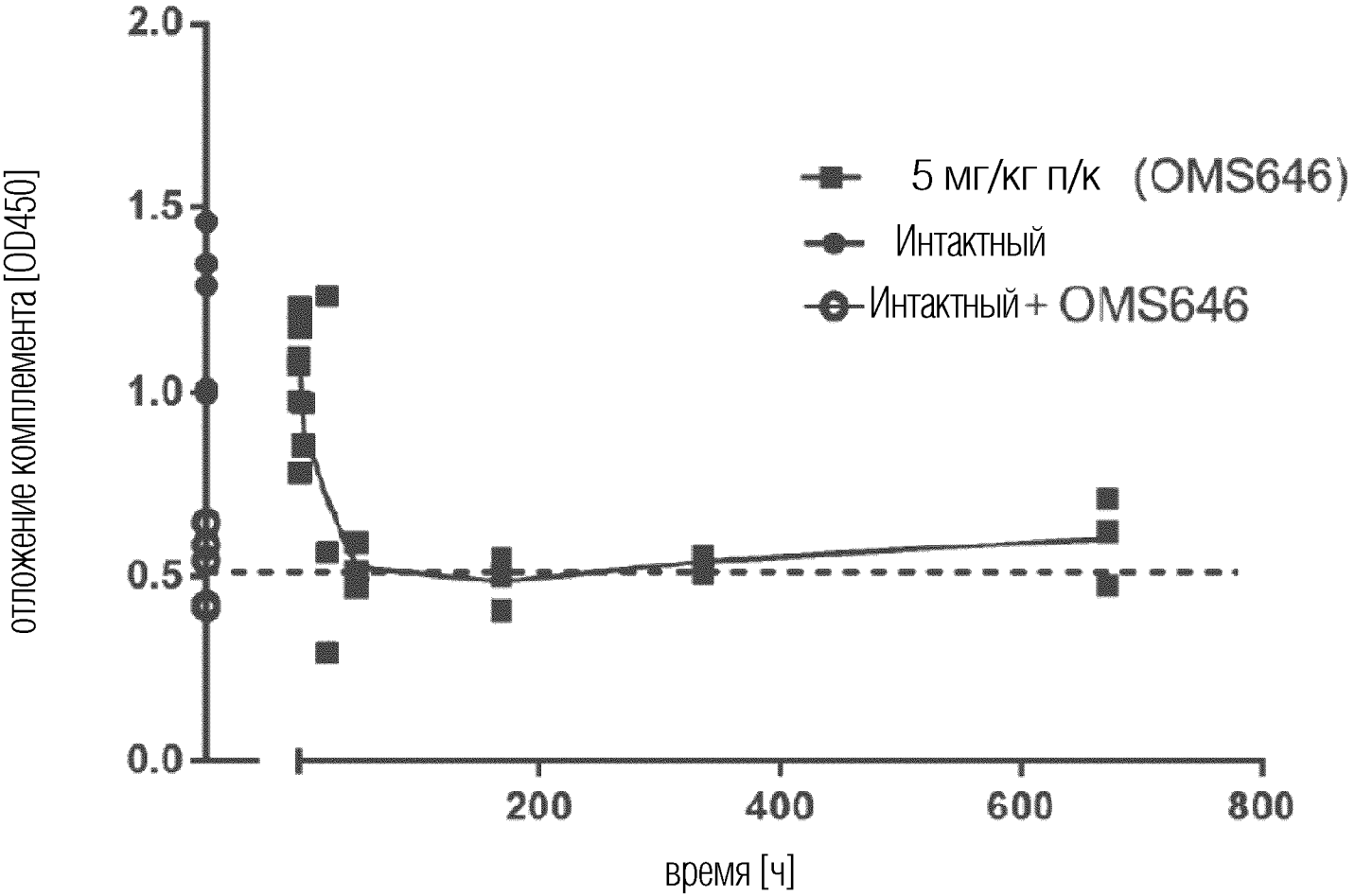
ФИГ. 12С


100000
10000
1000
100
OMS646 [нг/мл]
0
200
400
600
800
время [ч]
5 мг/кг п/к
5 мг/кг в/в
15 мг/кг п/к

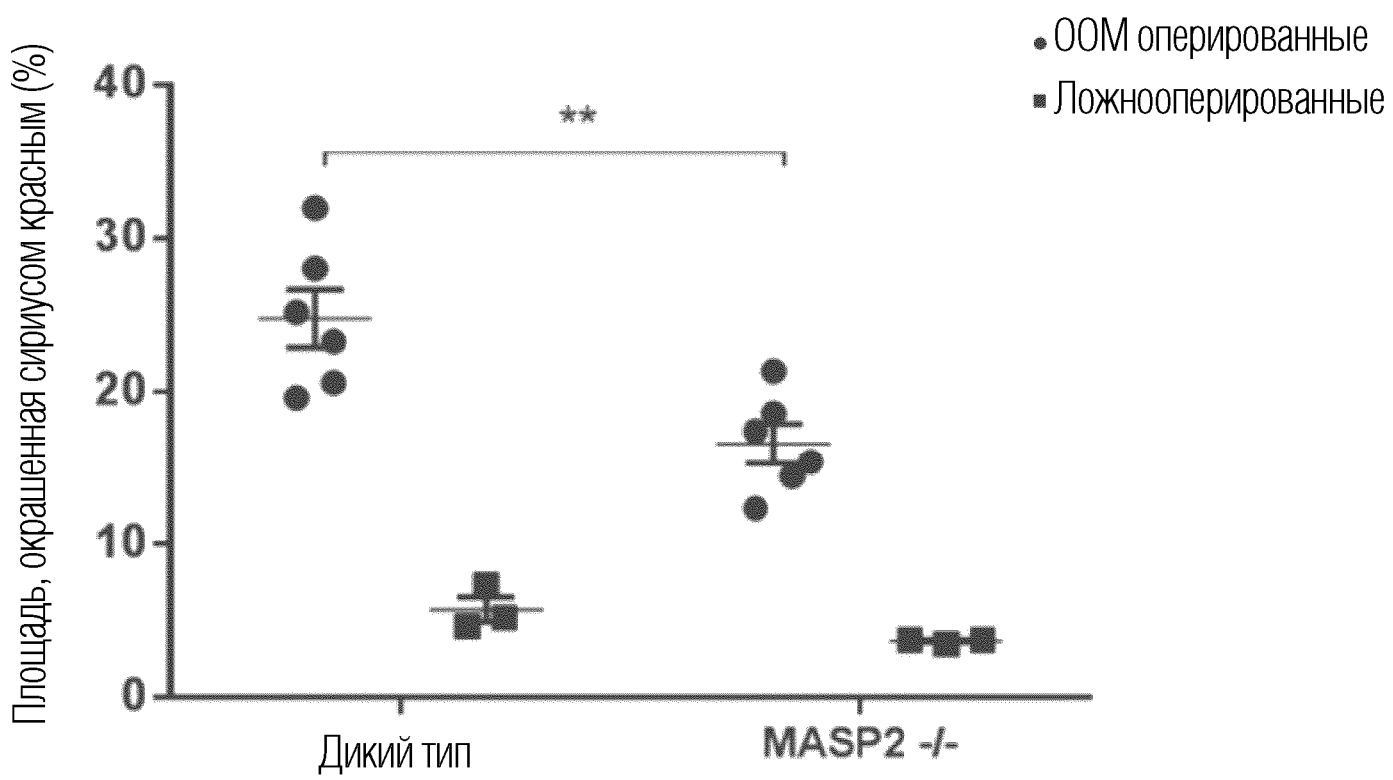
ФИГ. 13


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
отложение комплемента [OD450]
5 мг/кг в/в (OMS646)
Интактный
Интактный + OMS646
200
400
600
800
время [ч]

ФИГ. 14А

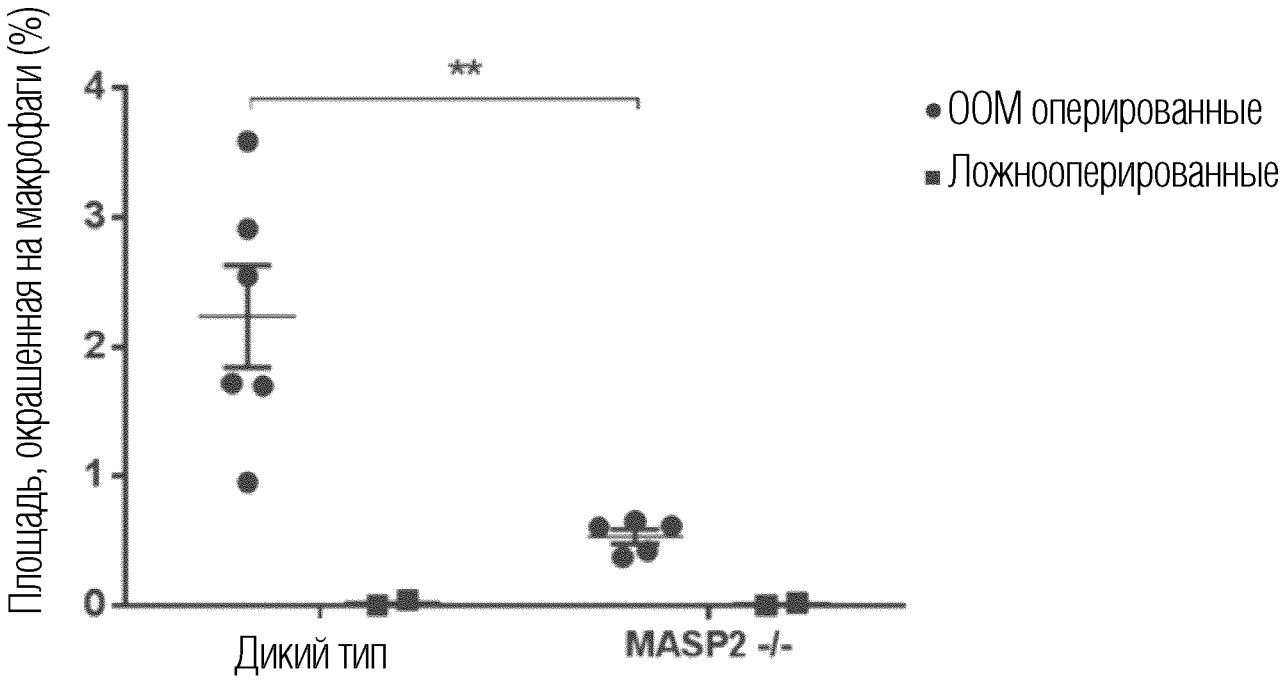

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
отложение комплемента [OD450]
200
400
600
800
время [ч]
5 мг/кг п/к (OMS646)
Интактный
Интактный + OMS646

ФИГ. 14B



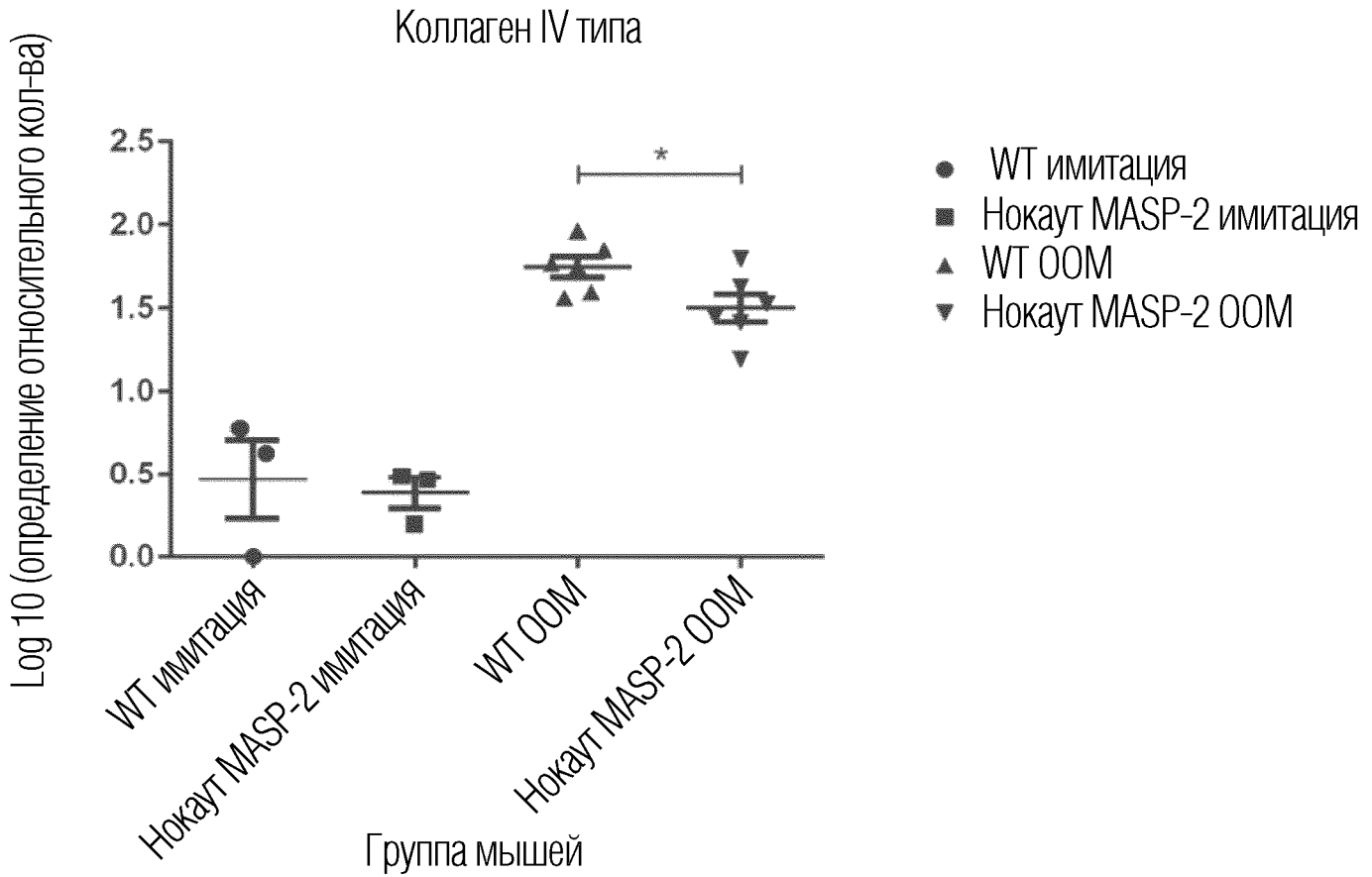
**p= 0.0096

ФИГ. 15



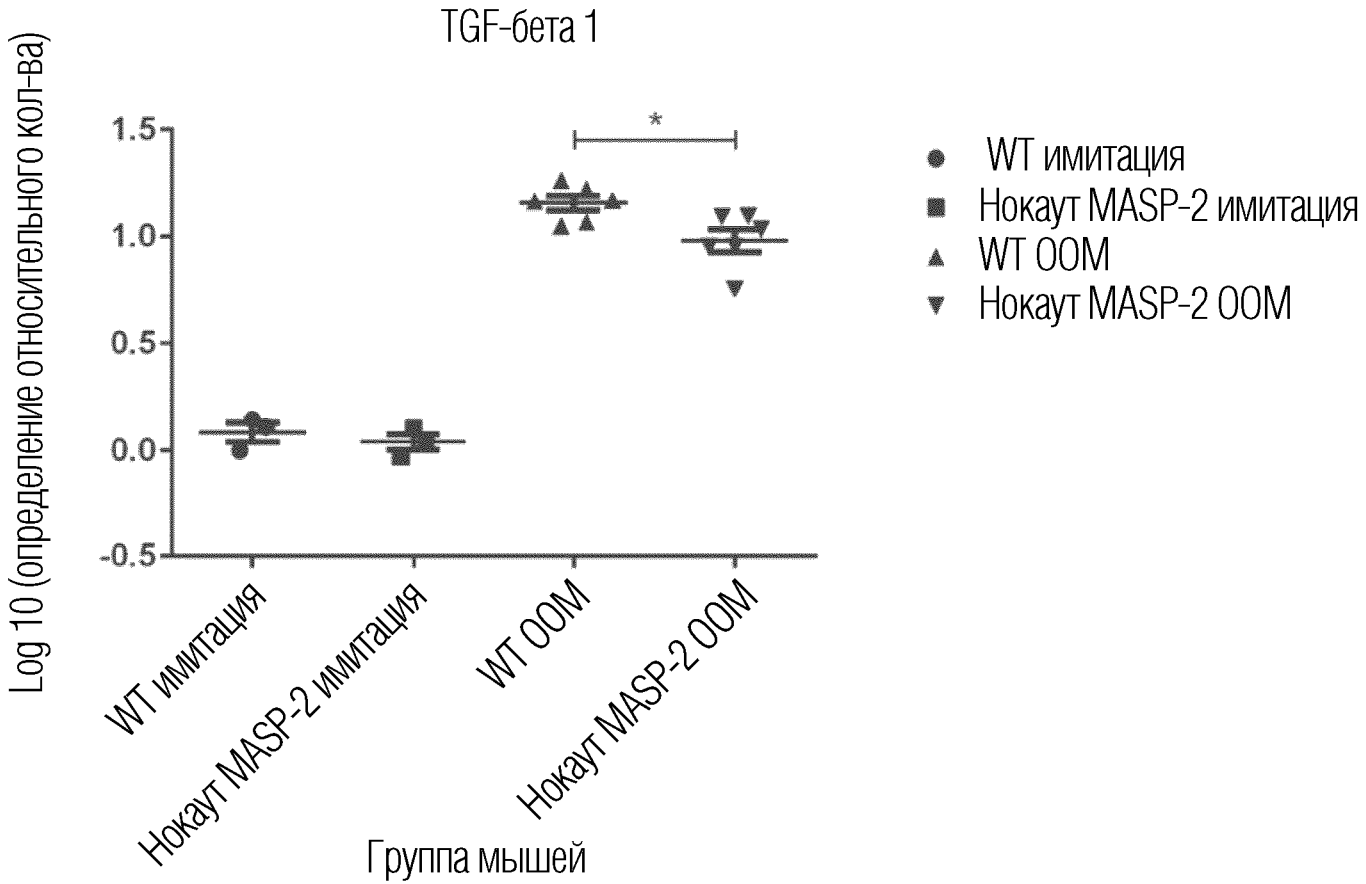
**p=0.0035

ФИГ. 16



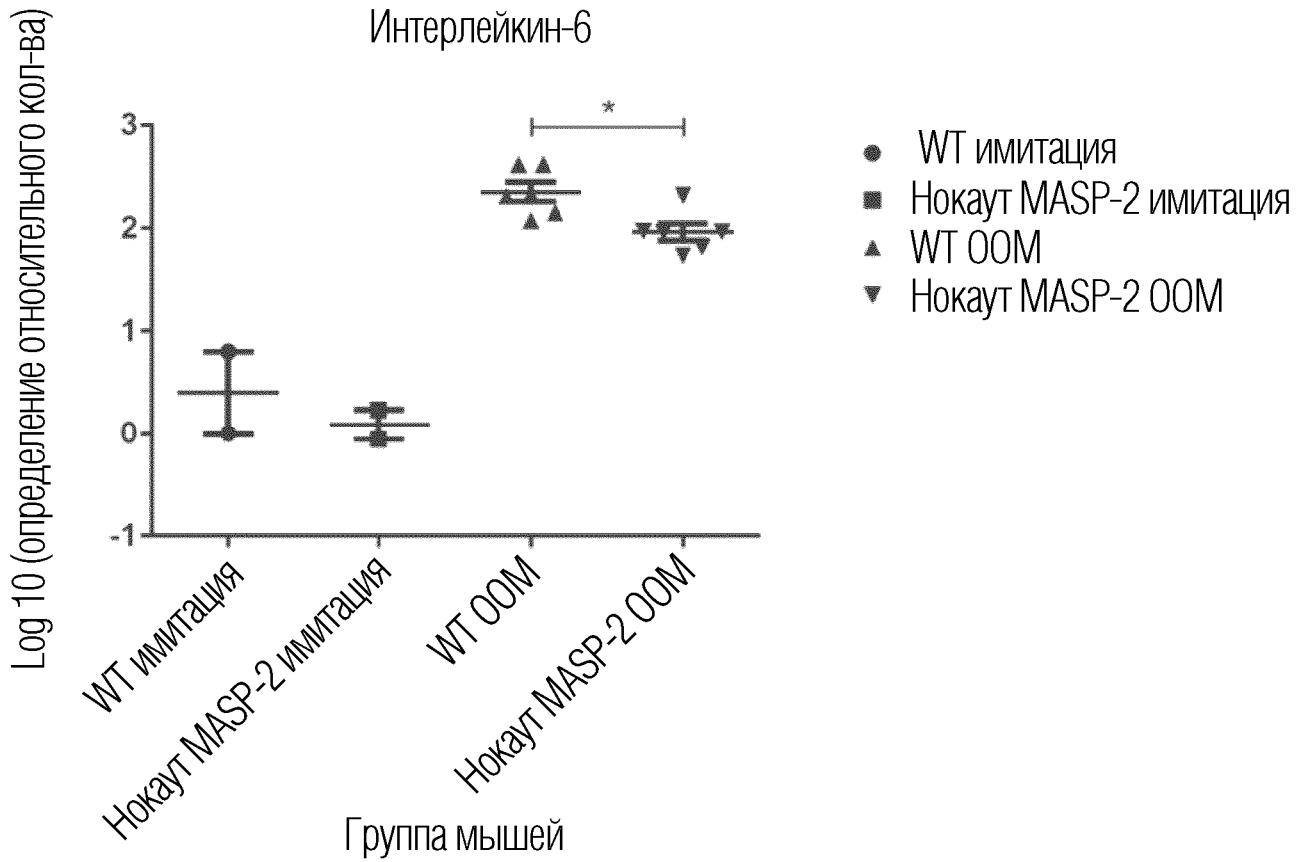
*p=0.0388

ФИГ. 17



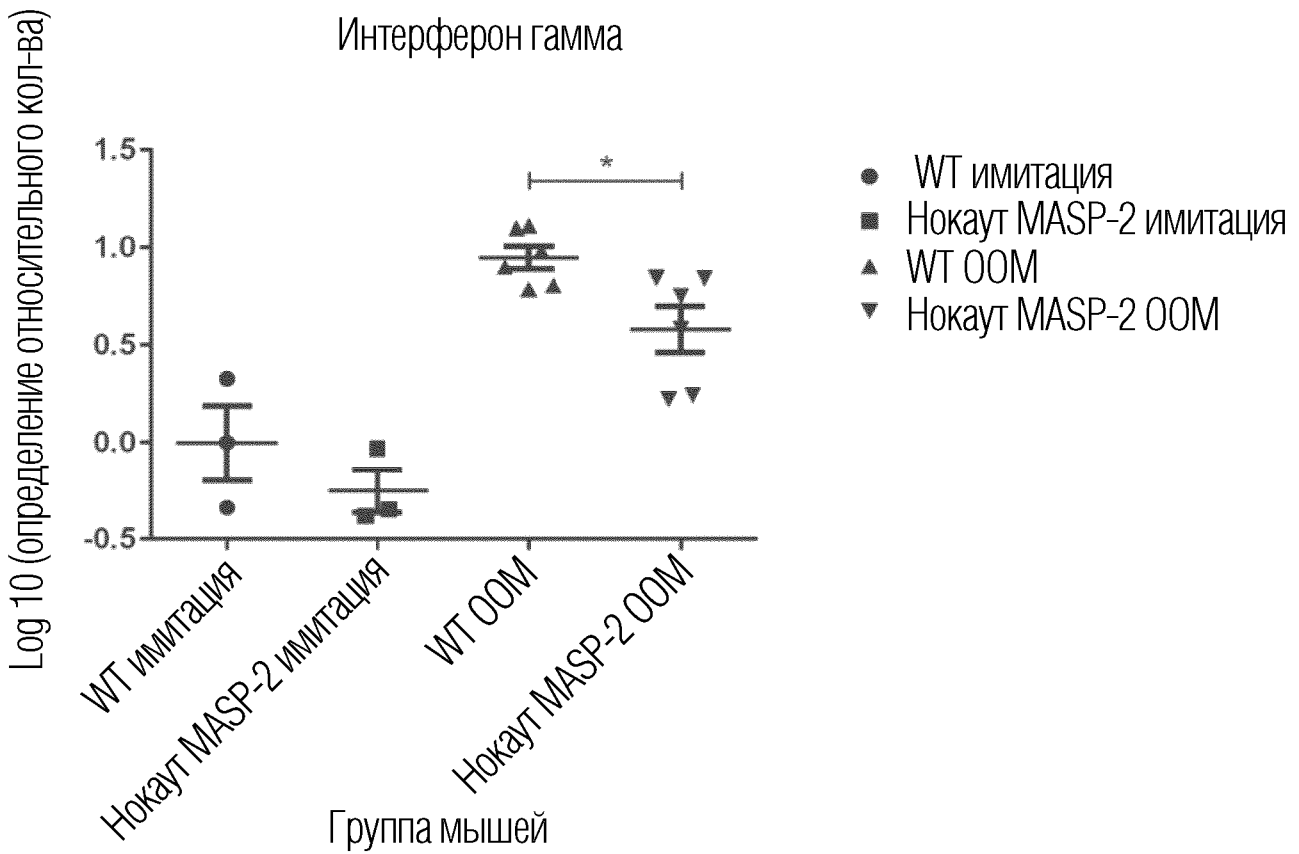
*p=0.0174

ФИГ. 18



*p=0.0109

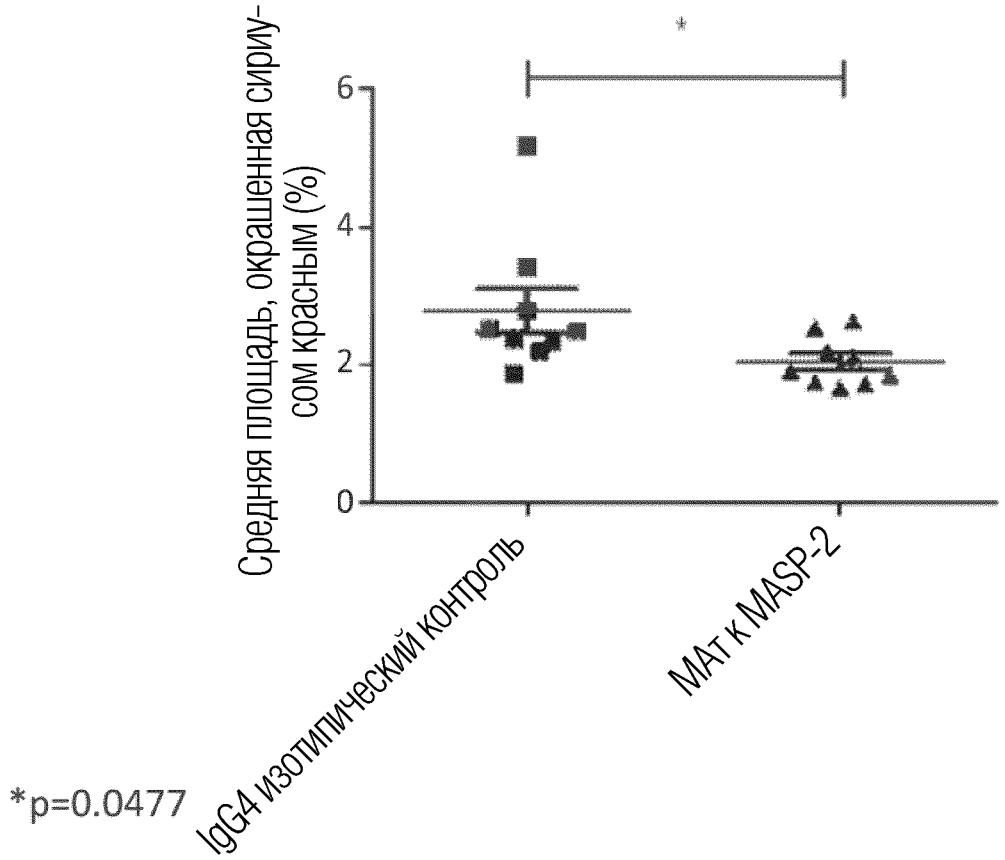
ФИГ. 19



*p=0.0182

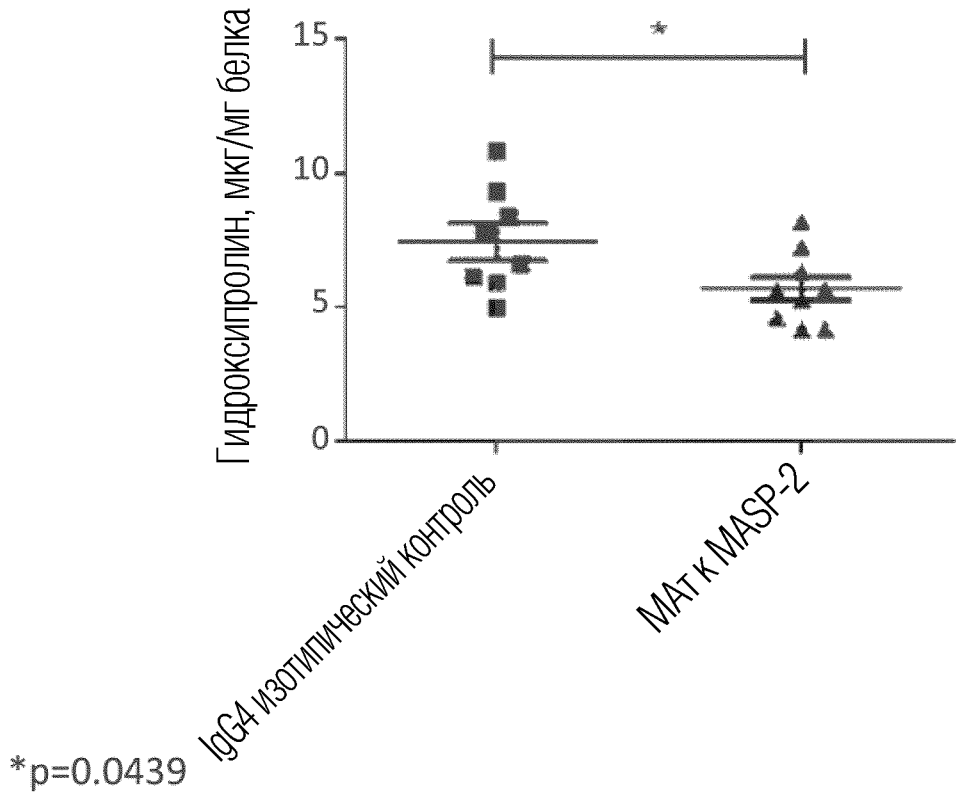
ФИГ. 20

Окрашивание сириусом красным почек, собранных через 7 дней после ООМ

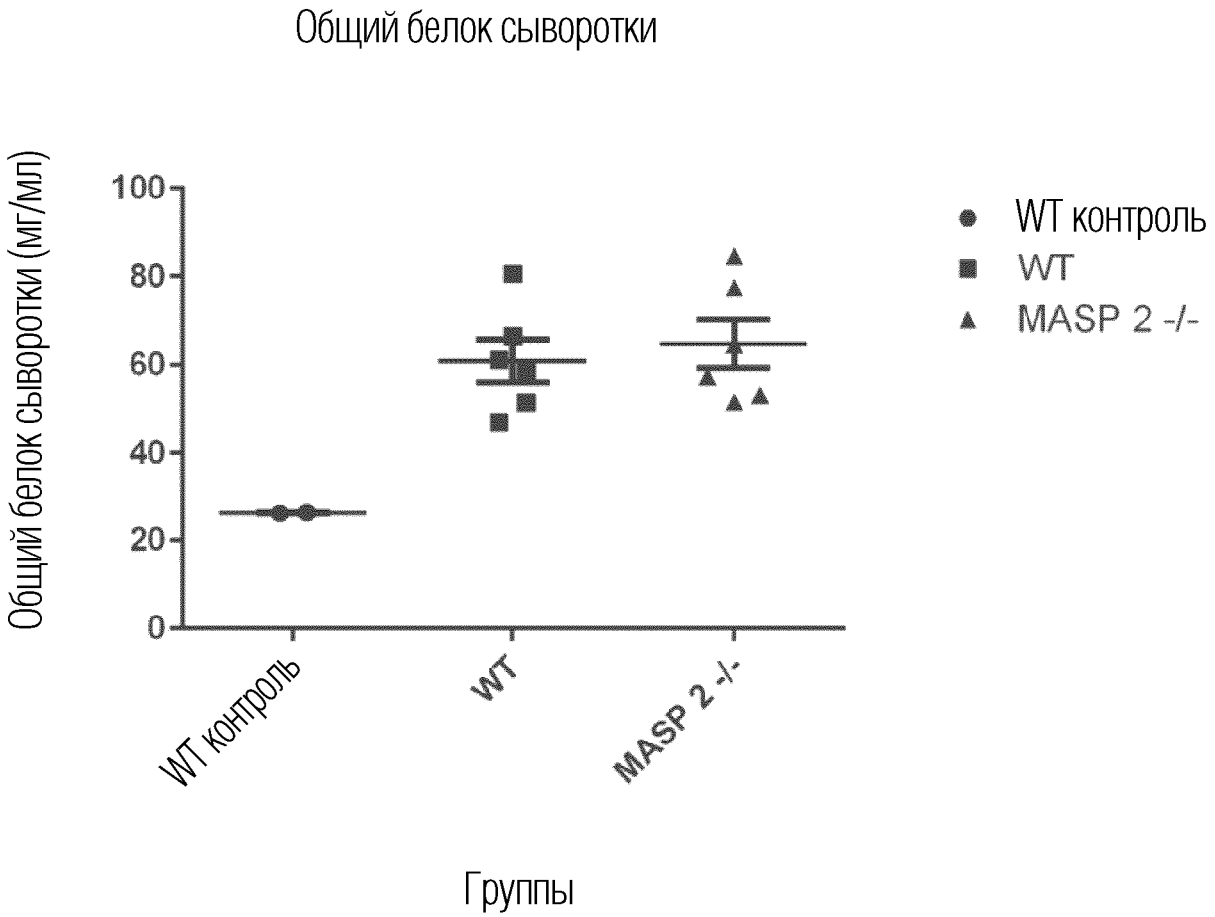


ФИГ. 21

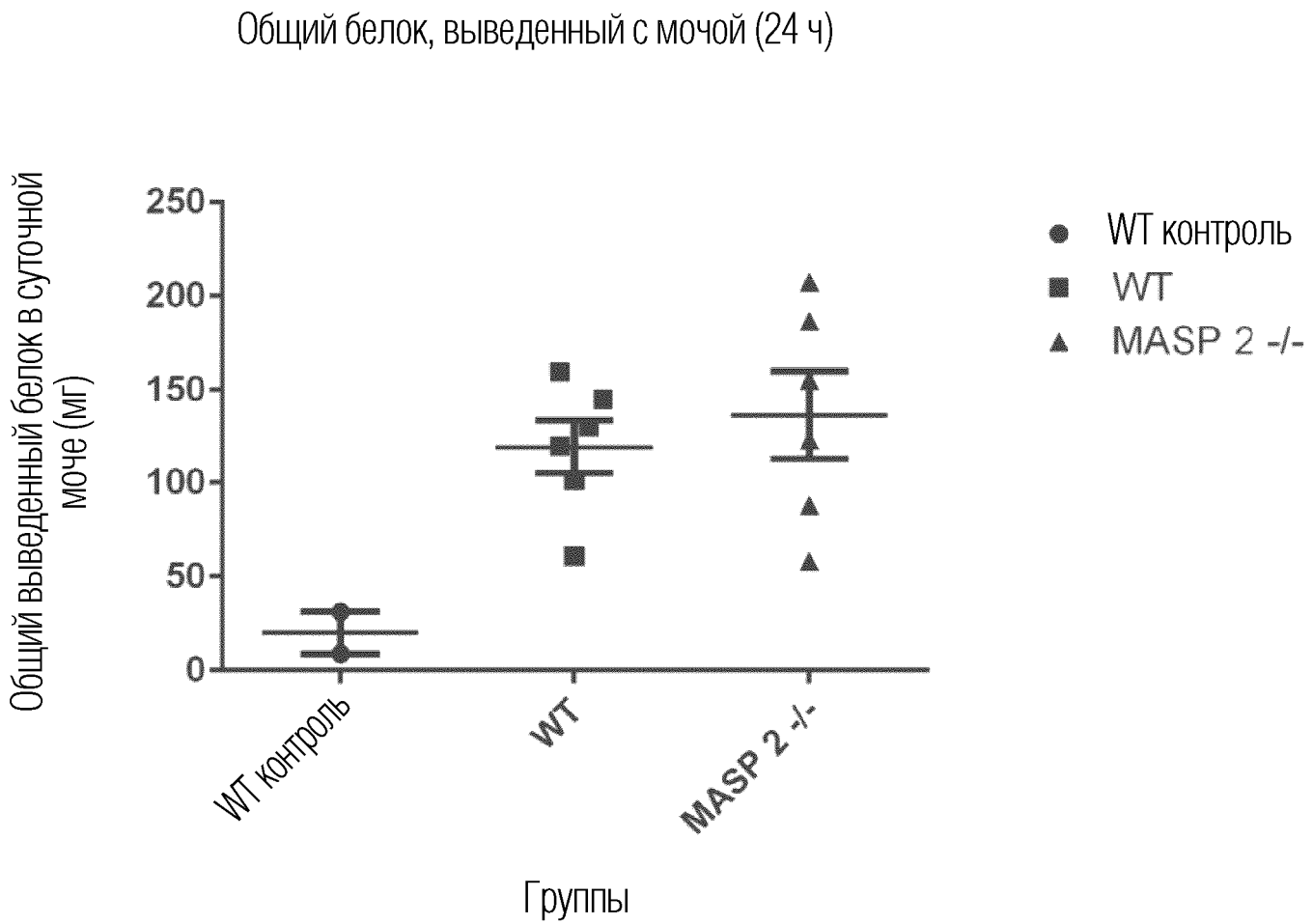
Содержание гидроксипролина в почках, собранных через 7 дней после ООМ



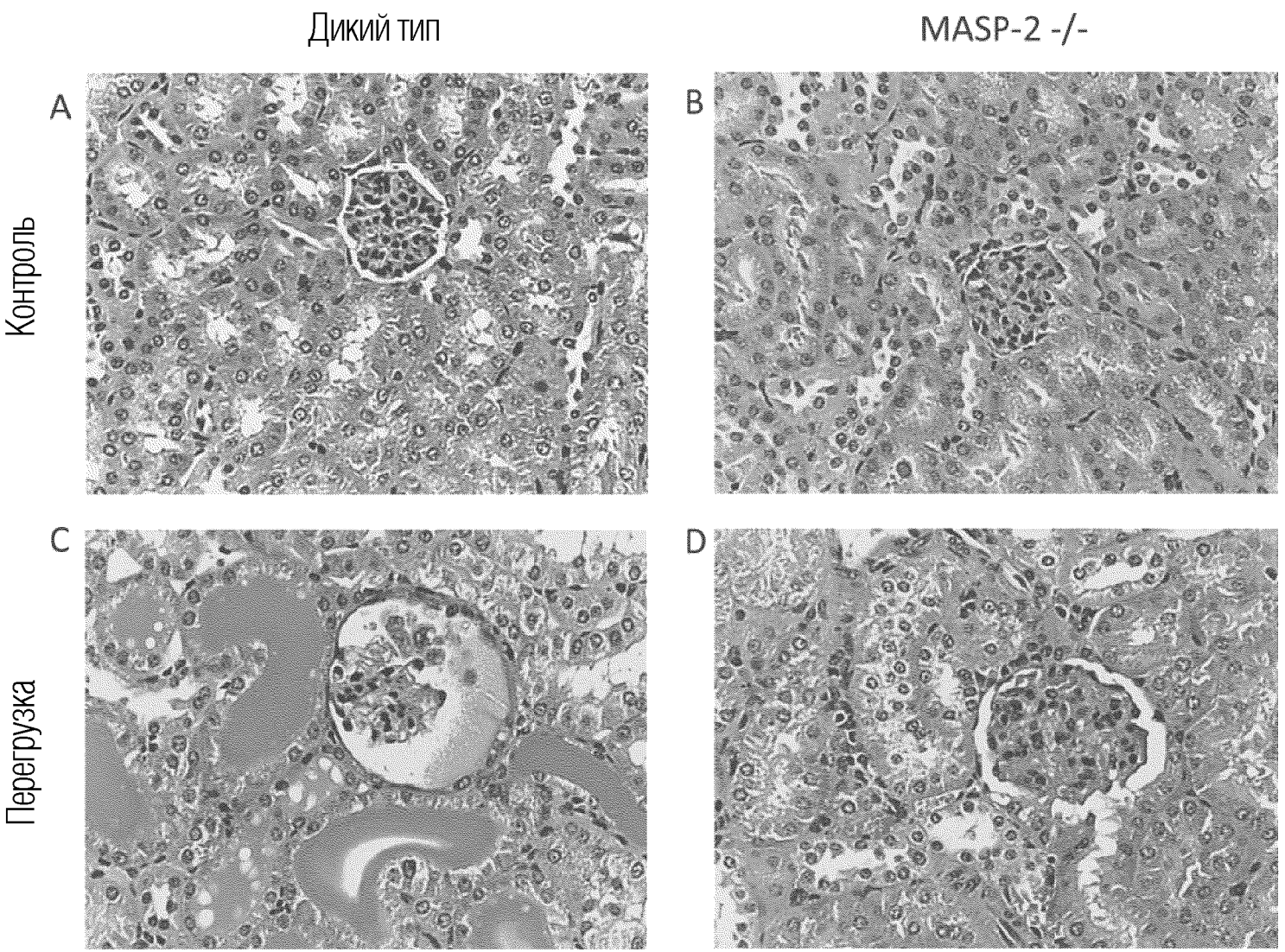
ФИГ. 22


Общий белок сыворотки
Общий белок сыворотки (мг/мл)
100
80
60
40
20
0
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
Группы

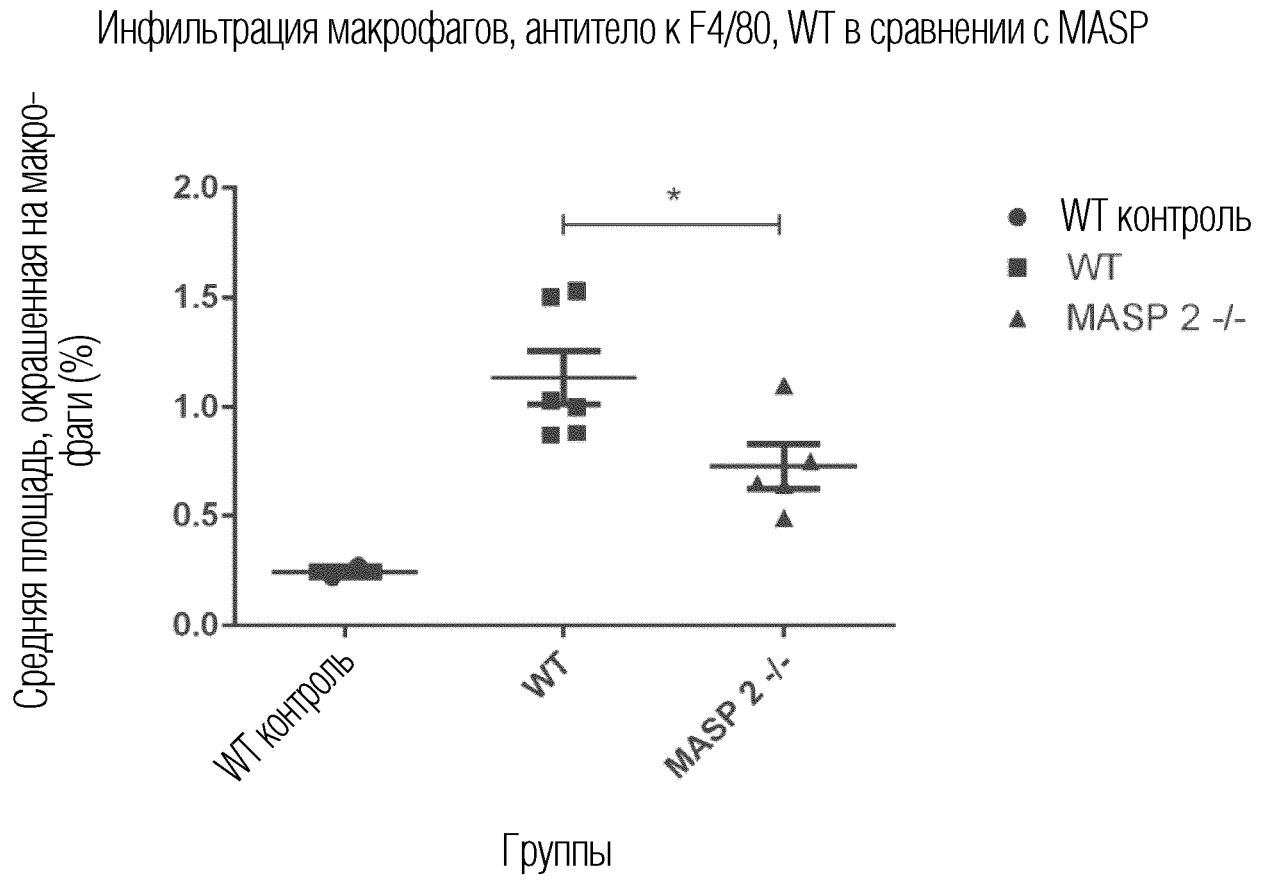
ФИГ. 23


Общий белок, выведенный с мочой (24 ч)
Общий выведенный белок в суточной моче (мг)
250
200
150
100
50
0
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
Группы
WT контроль
WT
MASP 2 -/-

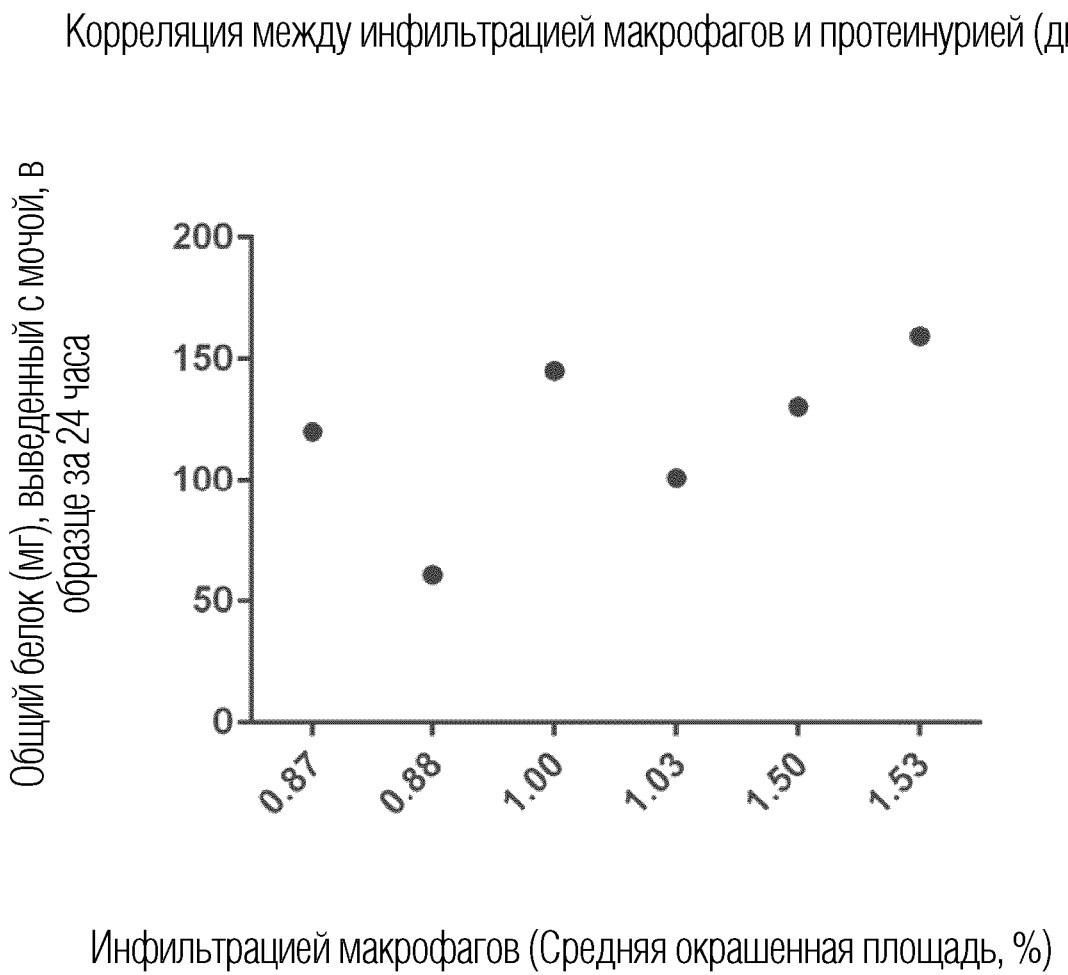
ФИГ. 24



ФИГ. 25


Инфильтрация макрофагов, антитело к F4/80, WT в сравнении с MASP
Средняя площадь, окрашенная на макрофаги (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
Группы
*p=0.035

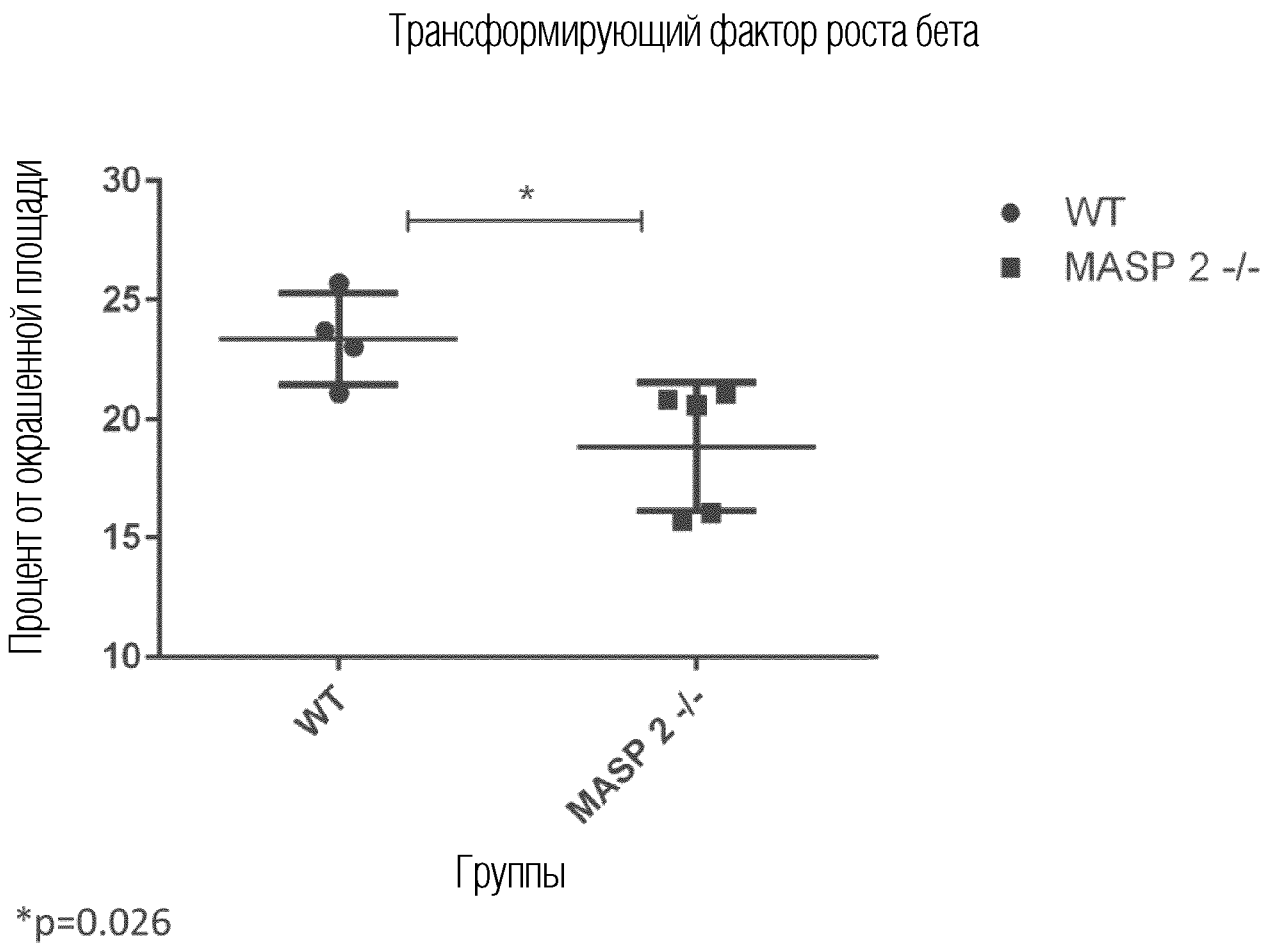
ФИГ. 26


Корреляция между инфильтрацией макрофагов и протеинурией (дикий тип)
Общий белок (мг), выведенный с мочой, в образце за 24 часа
200
150
100
50
0
0.87
0.88
1.00
1.03
1.50
1.53
Инфильтрацией макрофагов (Средняя окрашенная площадь, %)

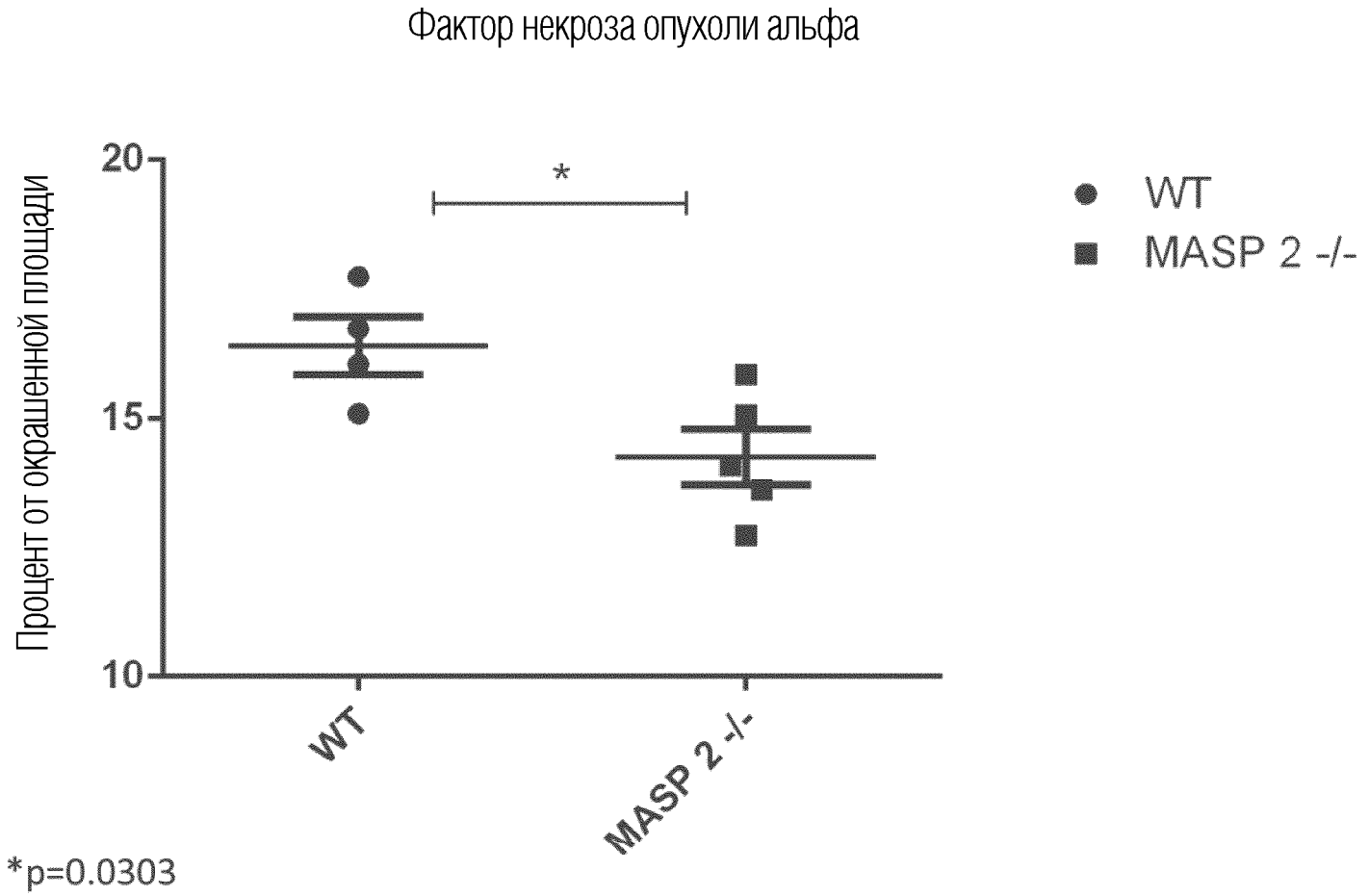
ФИГ. 27A


Корреляция между инфильтрацией макрофагов и протеинурией (MASP)
Общий белок (мг), выведенный с мочой, в образце за 24 часа
250
200
150
100
50
0
0.49
0.64
0.65
0.75
1.10
Инфильтрацией макрофагов (Средняя окрашенная площадь, %)

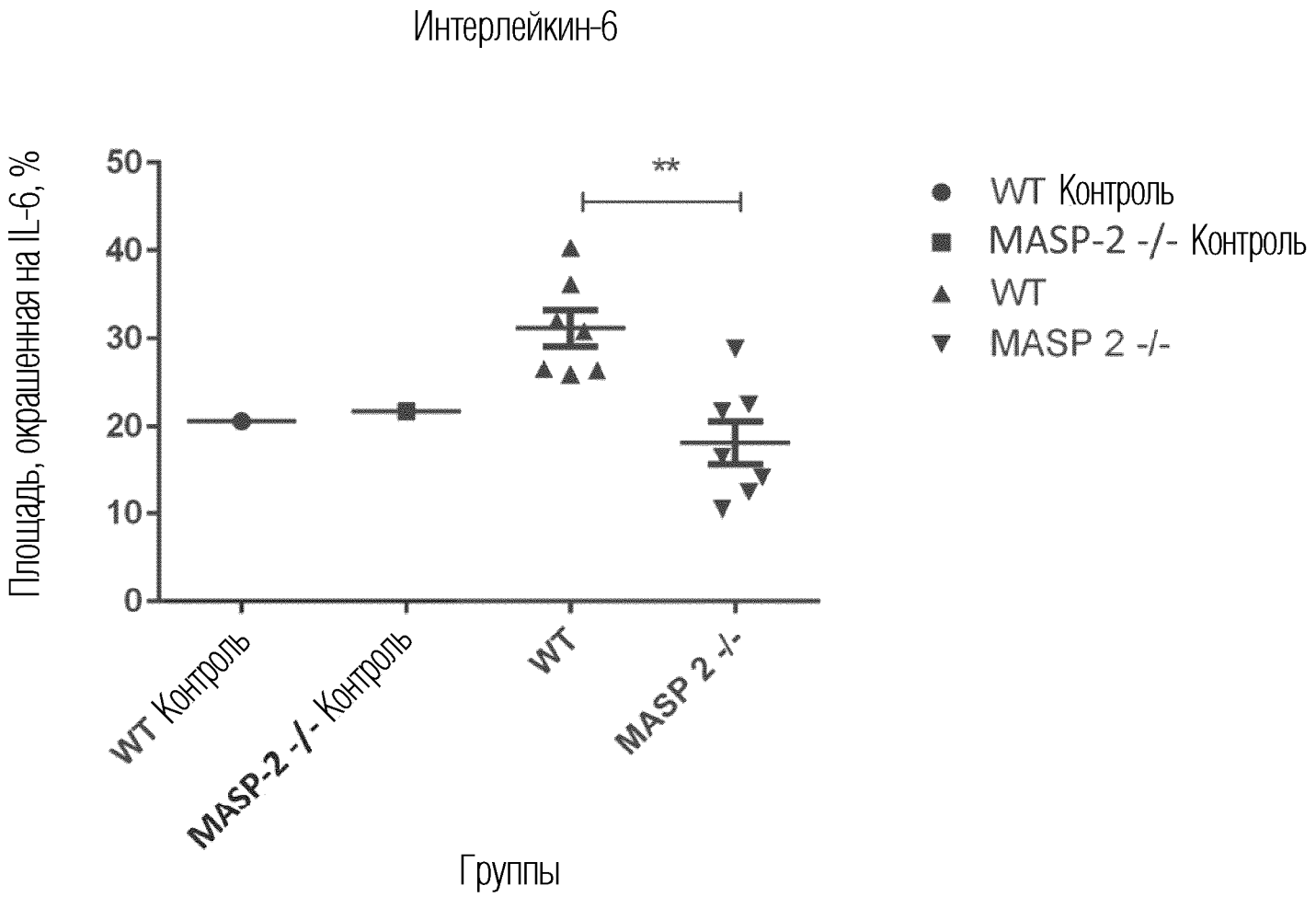
ФИГ. 27B


Трансформирующий фактор роста бета
Процент от окрашенной площади
30
25
20
15
10
*
WT
MASP 2 -/-
WT
MASP 2 -/-
Группы
*p=0.026

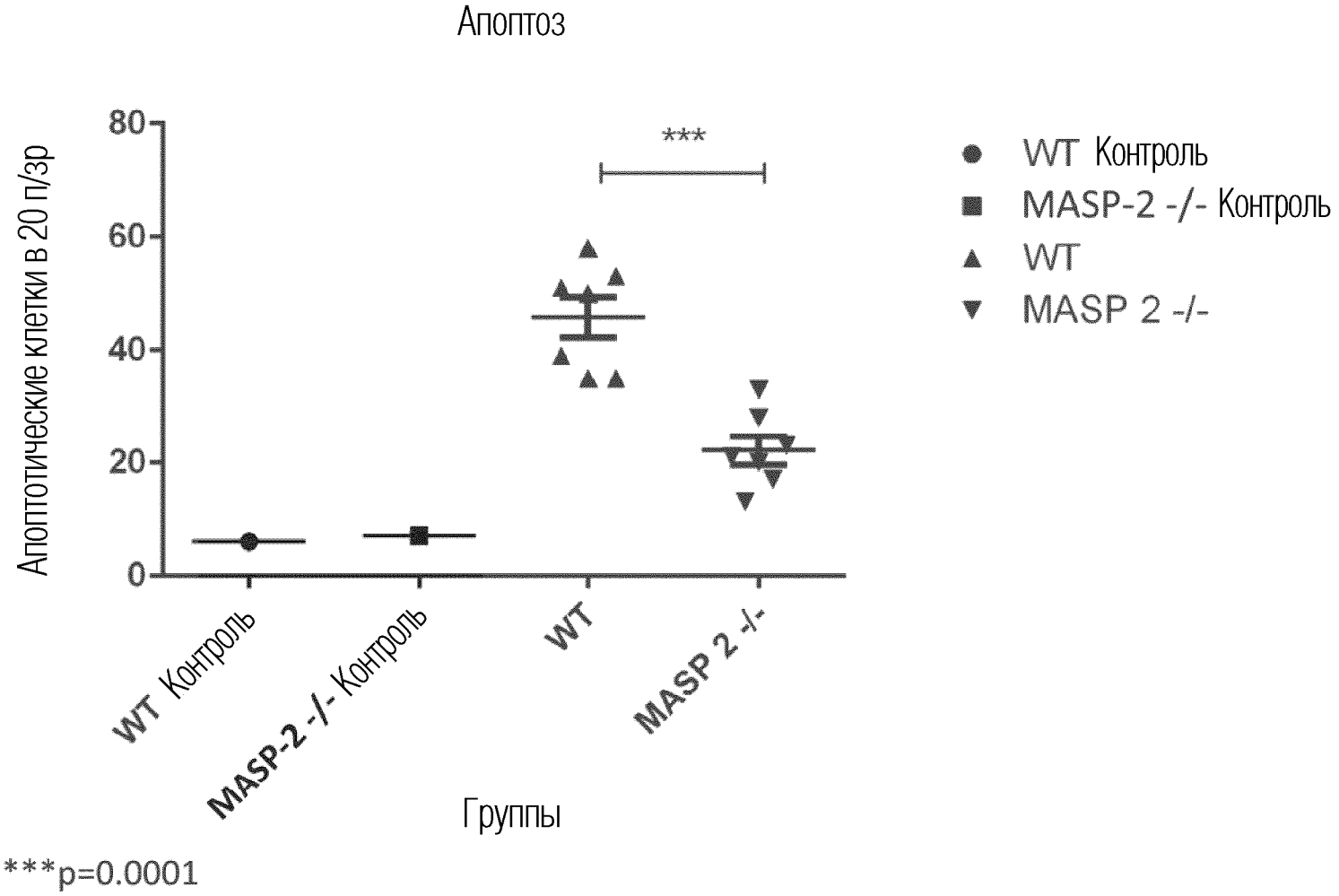
ФИГ. 28


Фактор некроза опухоли альфа
Процент от окрашенной площади
20
15
10
*
WT
MASP 2 -/-
WT
MASP 2 -/-
*p=0.0303

ФИГ. 29

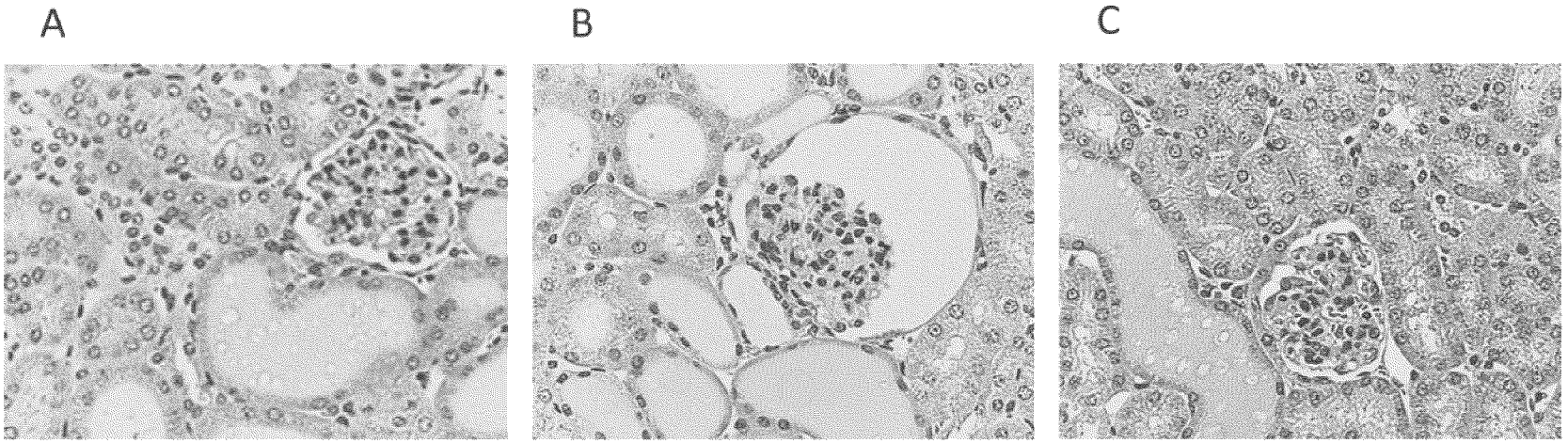

Интерлейкин-6
Площадь, окрашенная на IL-6, %
50
40
30
20
10
0
**
WT Контроль
MASP-2 -/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
Группы
WT Контроль
MASP-2 -/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
**p=0.0016

ФИГ. 30


Апоптоз
Апоптотические клетки в 20 п/зр
80
60
40
20
0
***
WT Контроль
MASP-2 -/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
Группы
***p=0.0001

ФИГ. 31

Патологические изменения окрашивание ГЭ

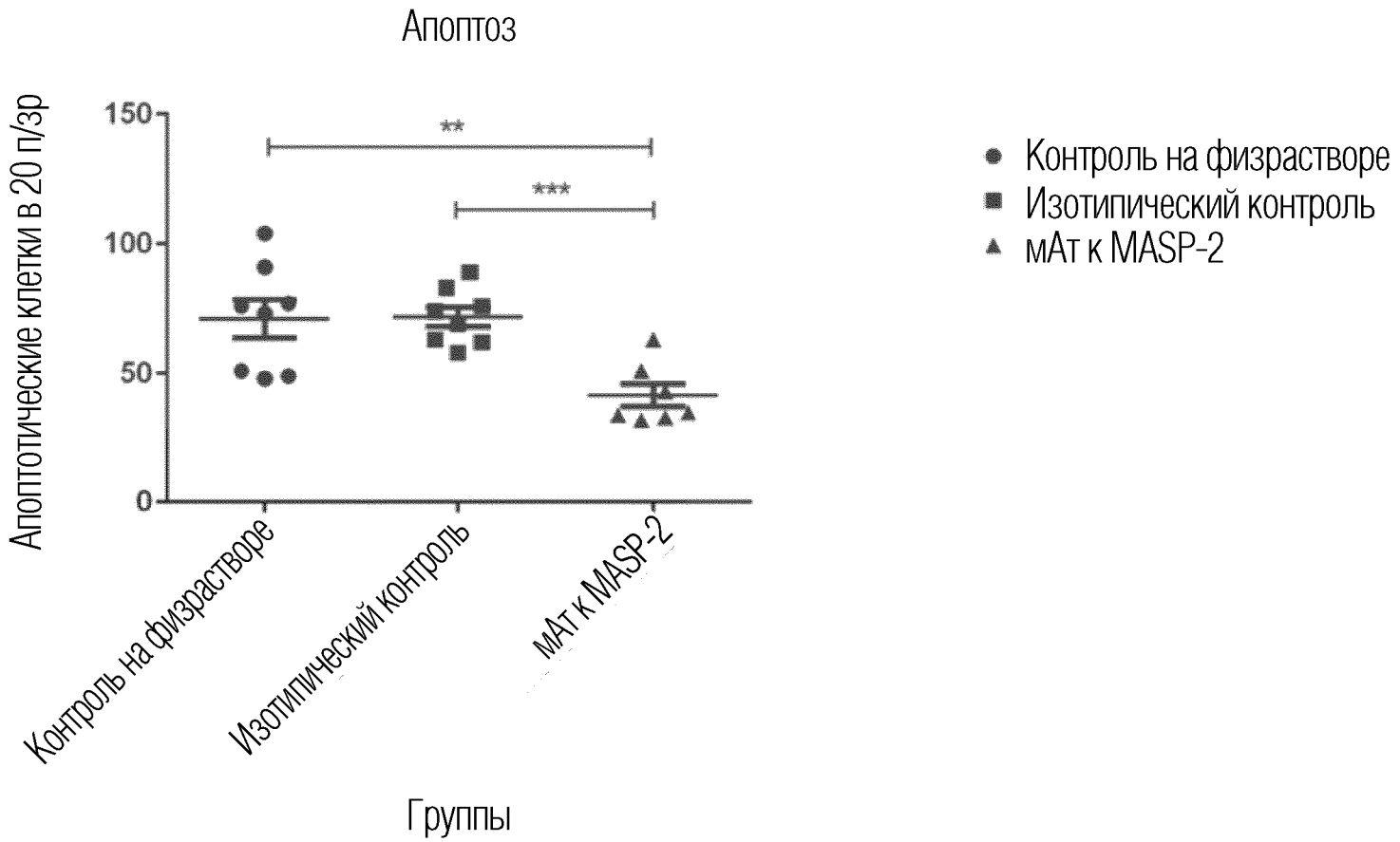


Контрольная группа на физрастворе

Группа изотипического контроля

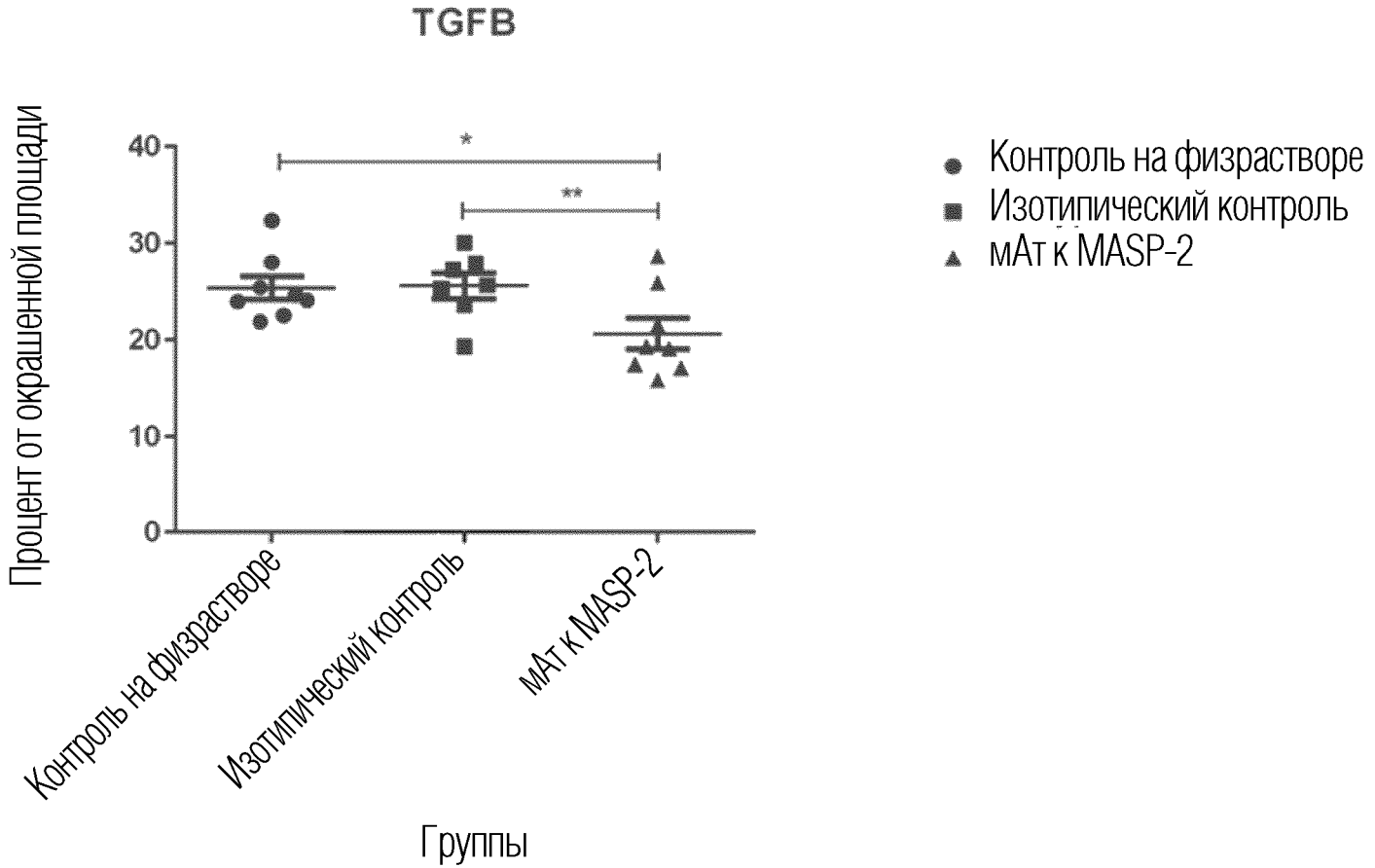
Группа, получавшая мАт к MASP-2

ФИГ. 32



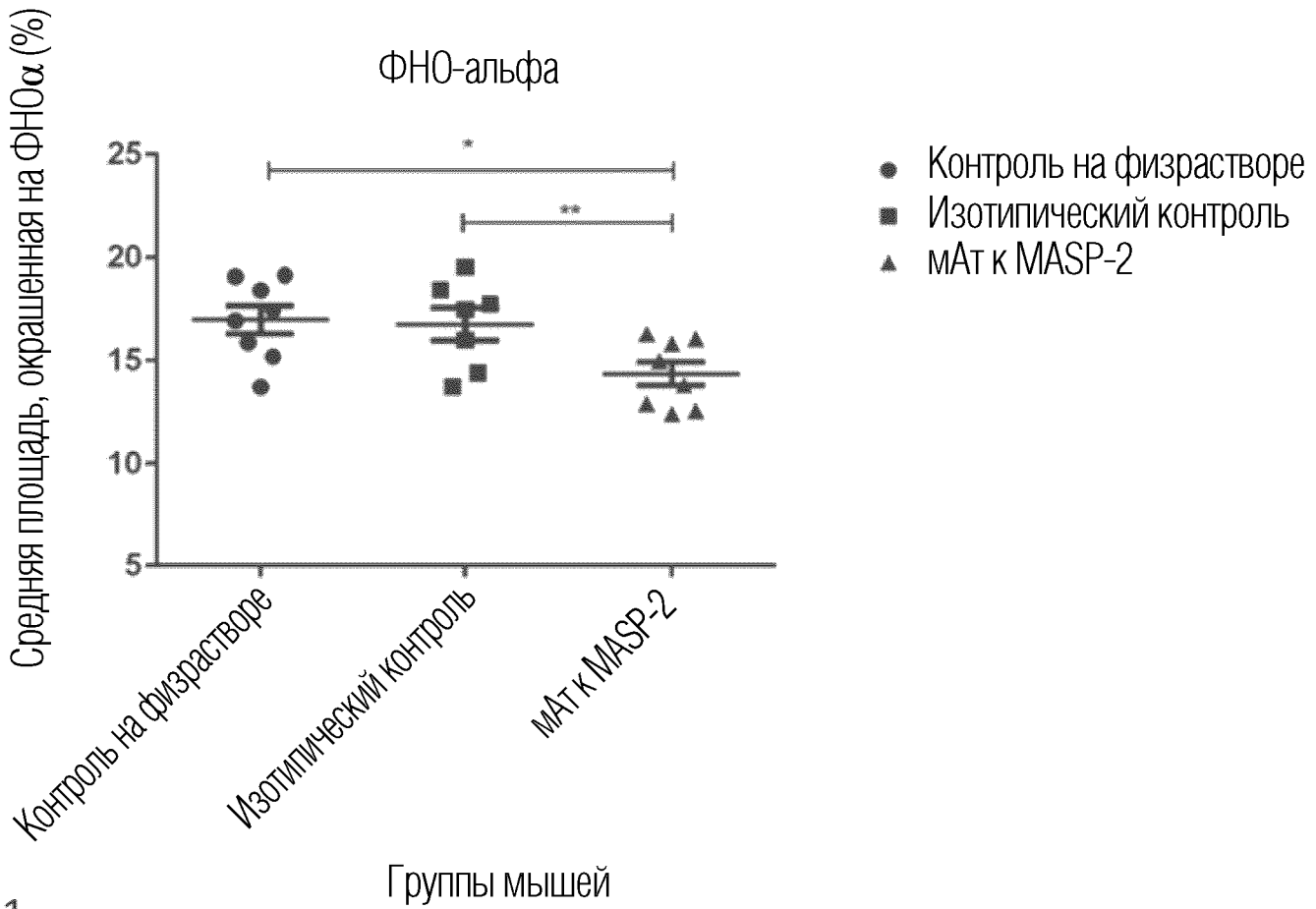
**p=0.0002
***p=0.0052

ФИГ. 33



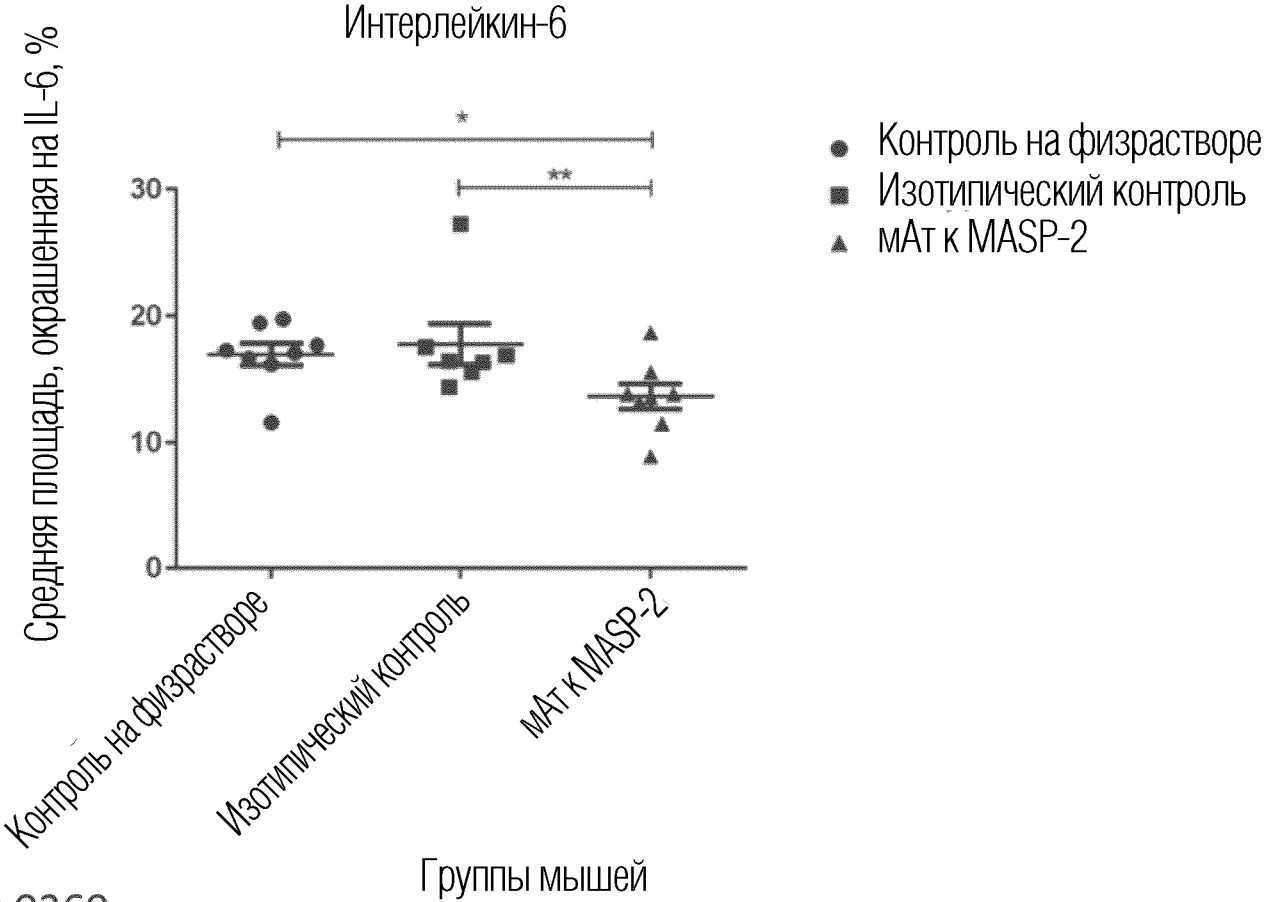
*p = 0.0324
**p=0.0349

ФИГ. 34



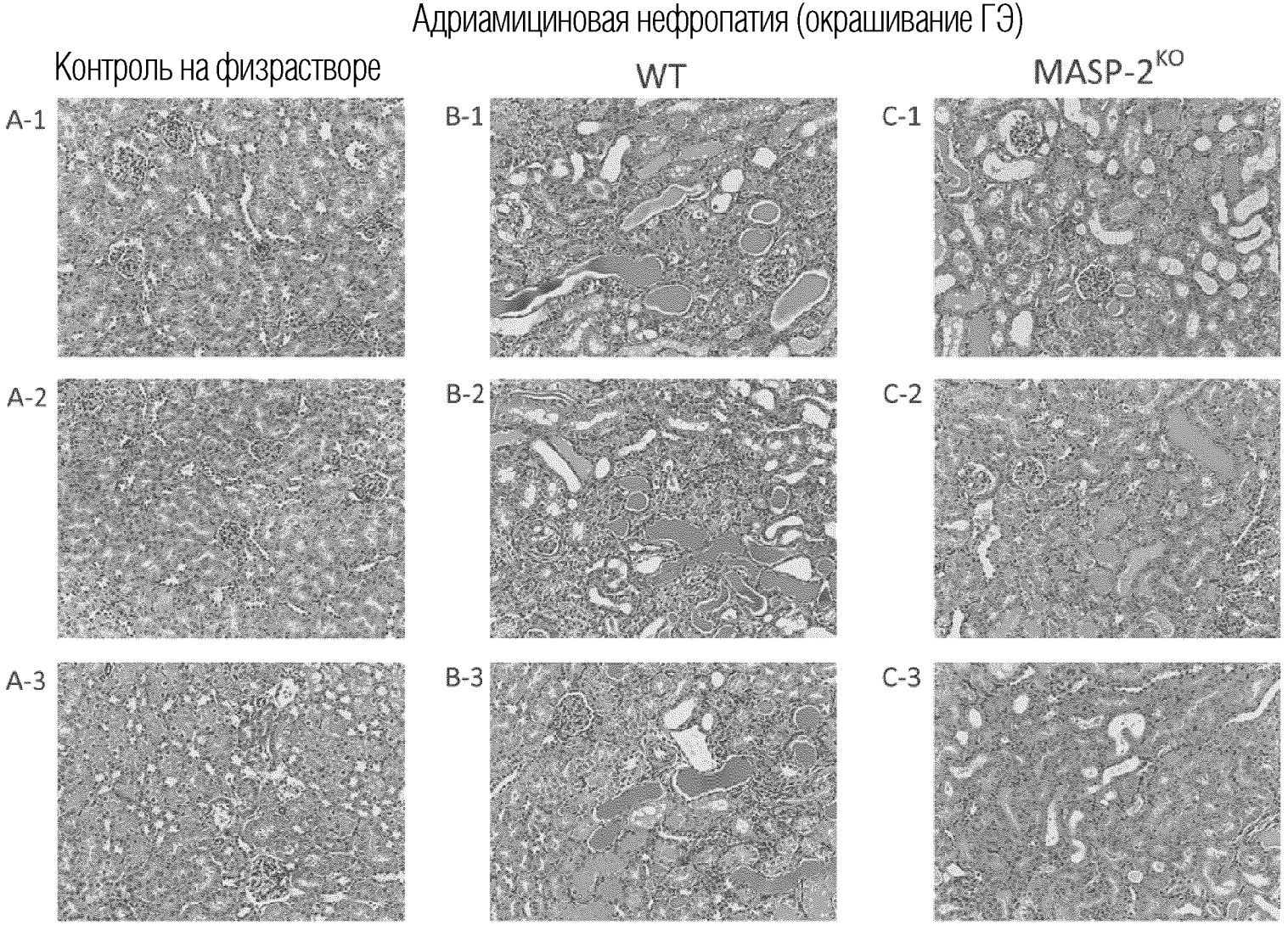
*p=0.011
**p=0.0285

ФИГ. 35

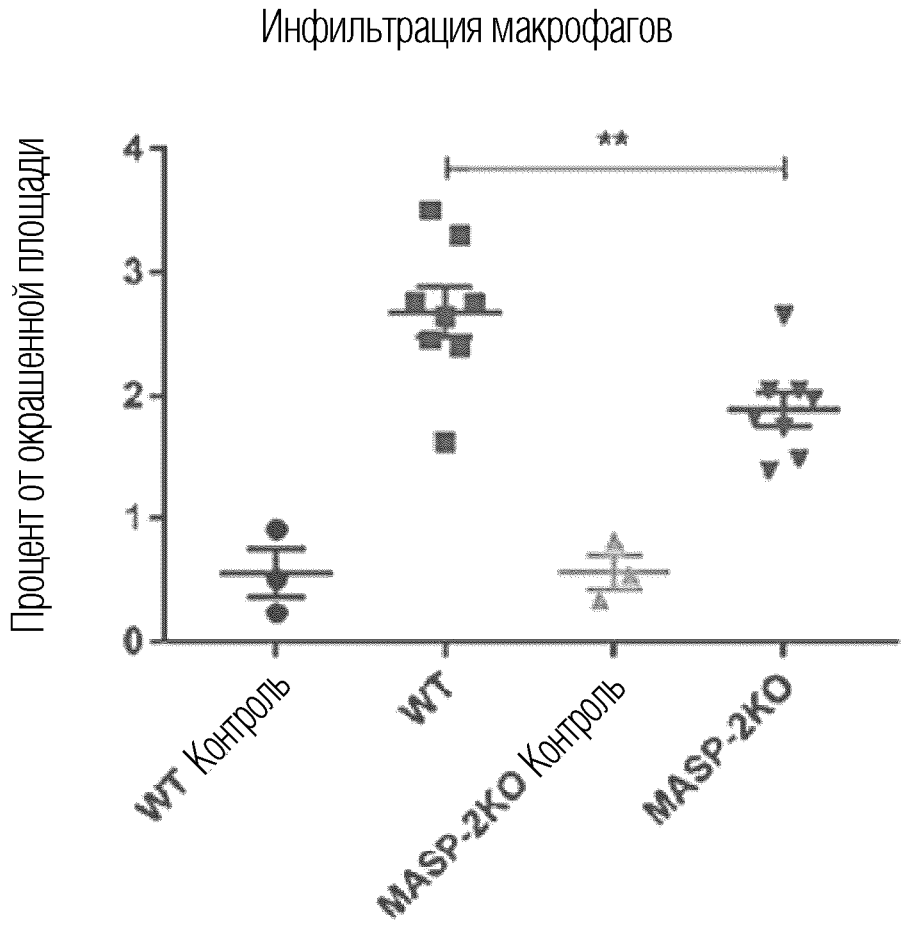


*p=0.0269
**p=0.0445

ФИГ. 36


Адриамициновая нефропатия (окрашивание ГЭ)
Контроль на физрастворе
WT
MASP-2KO
A-1
B-1
C-1
A-2
B-2
C-2
A-3
B-3
C-3

ФИГ. 37

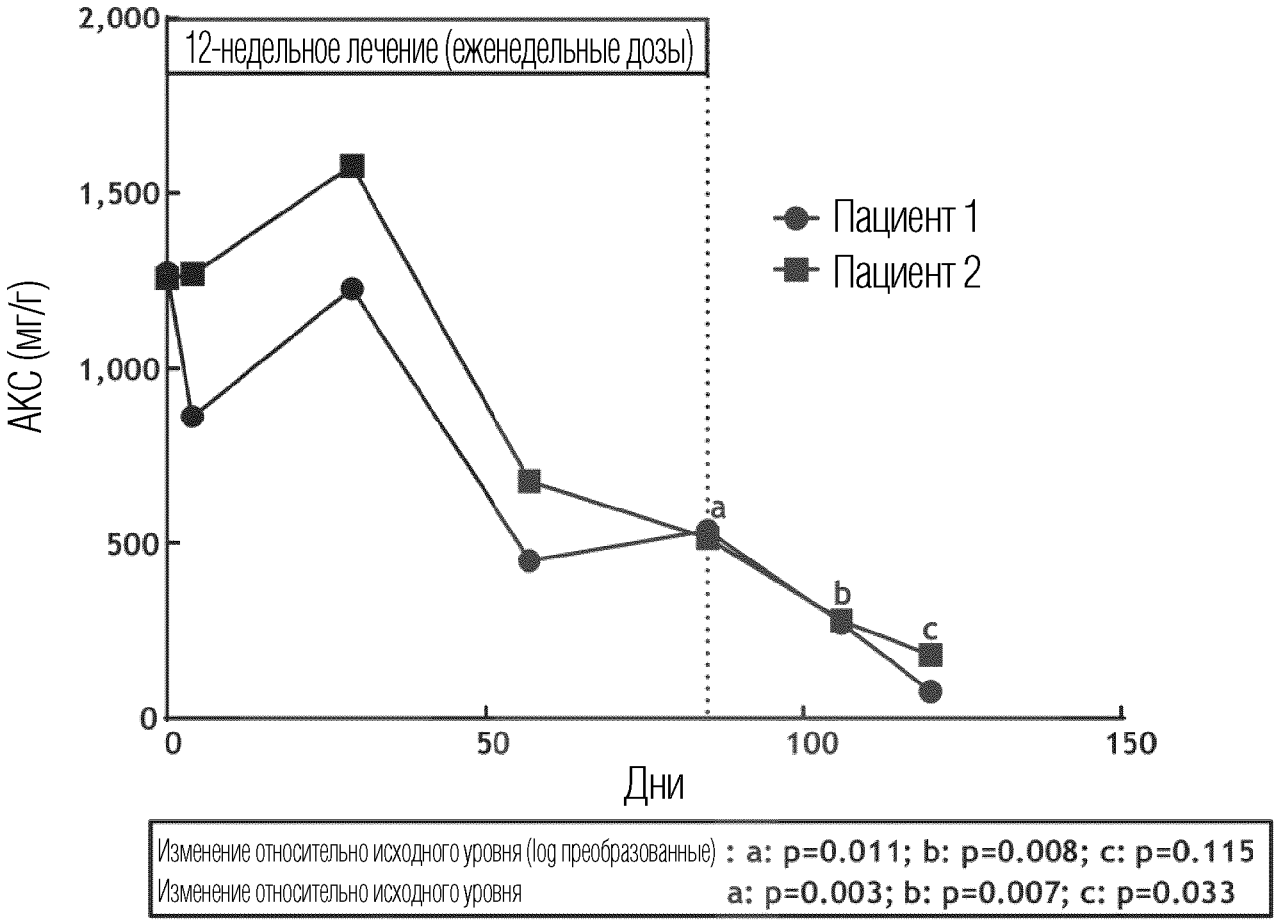

Инфильтрация макрофагов
Процент от окрашенной площади
4
3
2
1
0
**
WT Контроль
WT
MASP-2KO Контроль
MASP-2KO

ФИГ. 38

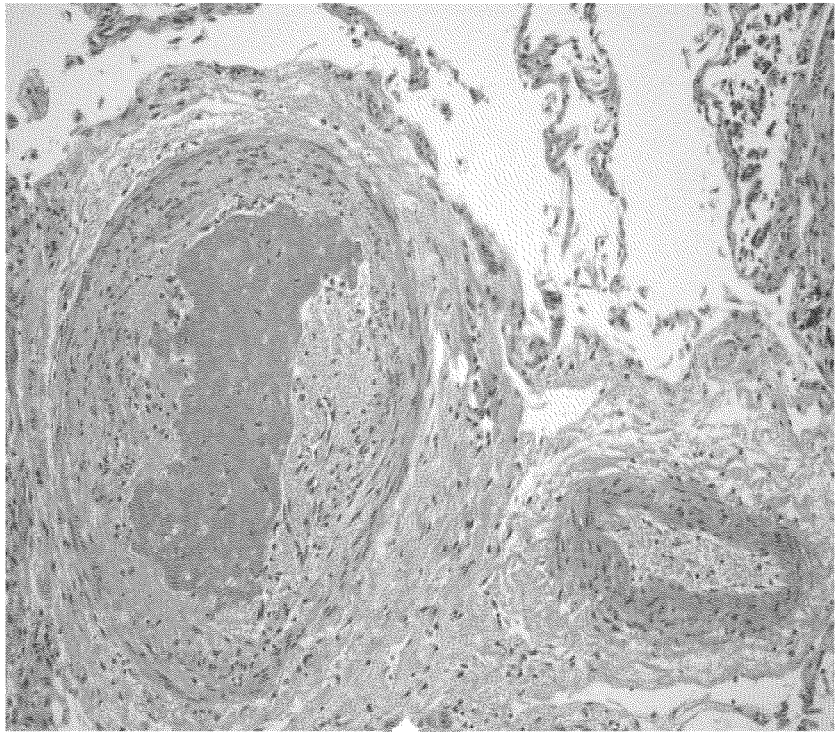
Отложение коллагена
Площадь, окрашенная сирусом красным (%)
30
20
10
0
**
WT Контроль
WT
MASP-2KO Контроль
MASP-2KO

ФИГ. 39

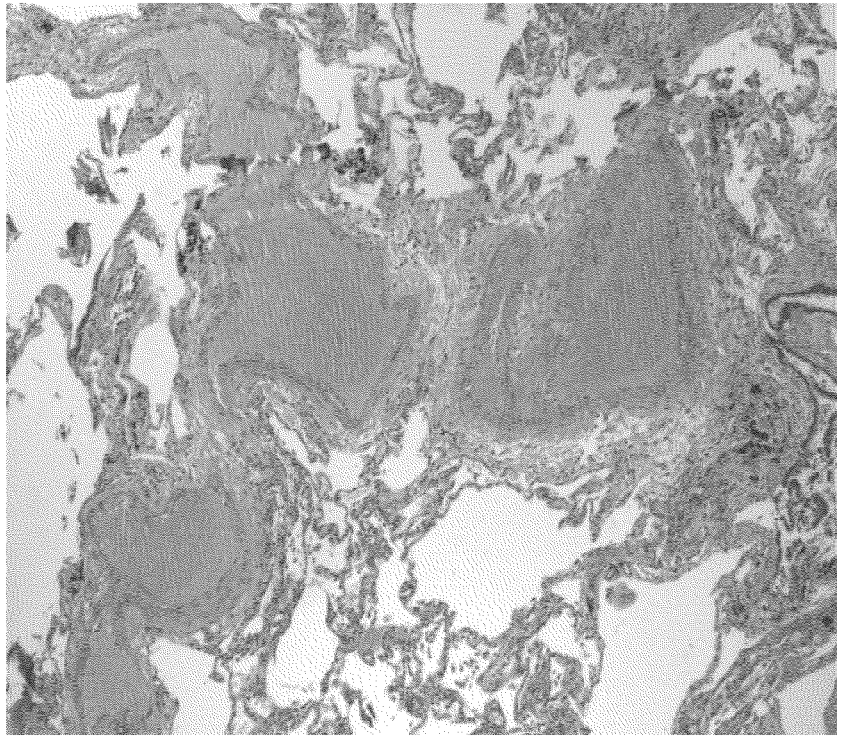
Альбумин/креатининовое соотношение в моче (АКС) у пациентов с IgAN, получавших OMS646



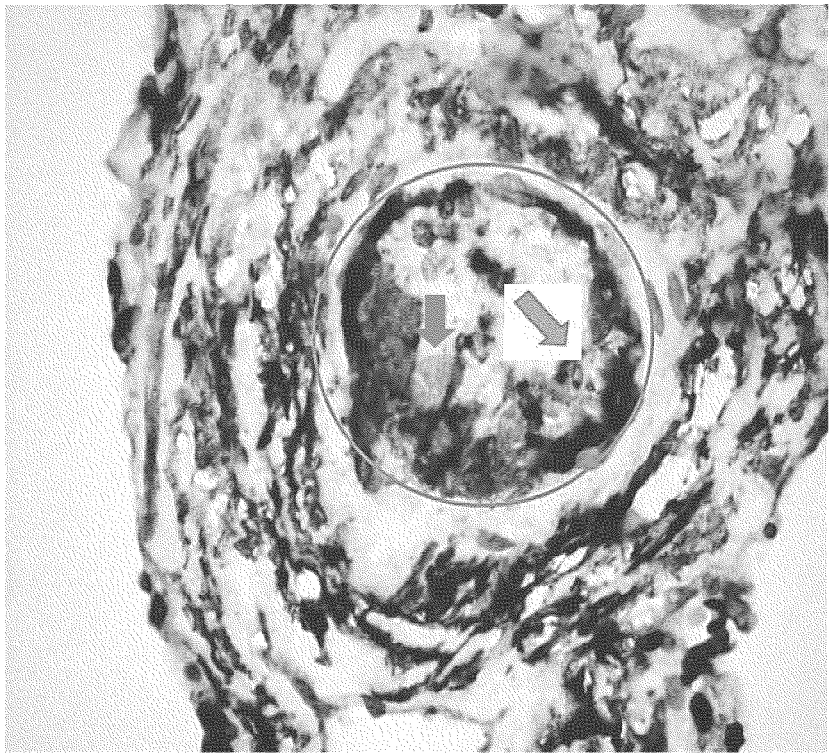
ФИГ. 40



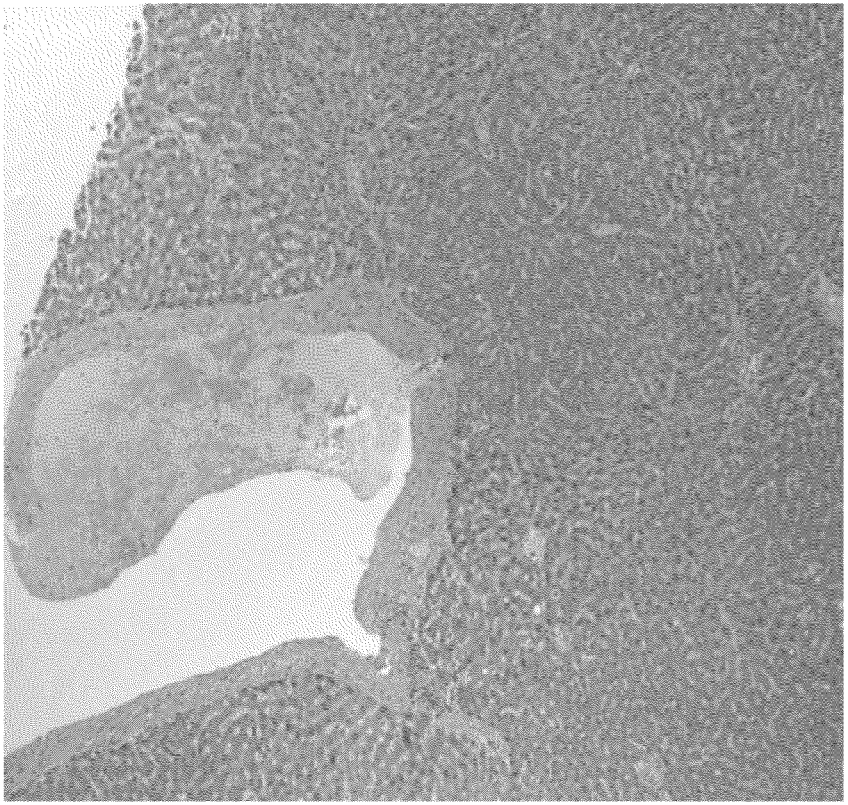
ФИГ. 41A



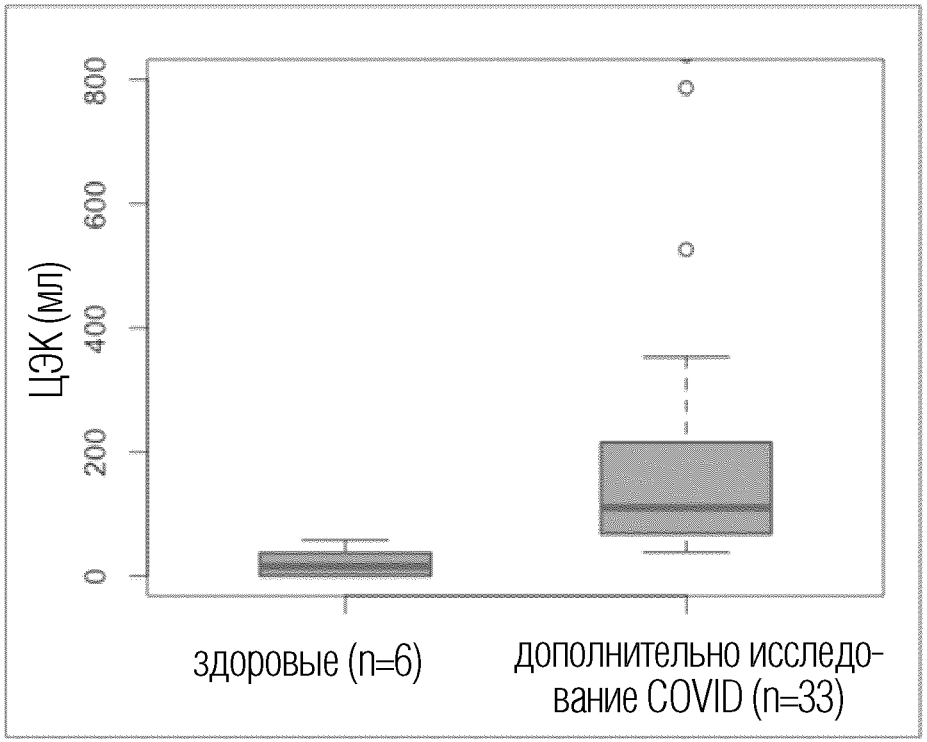
ФИГ. 41B



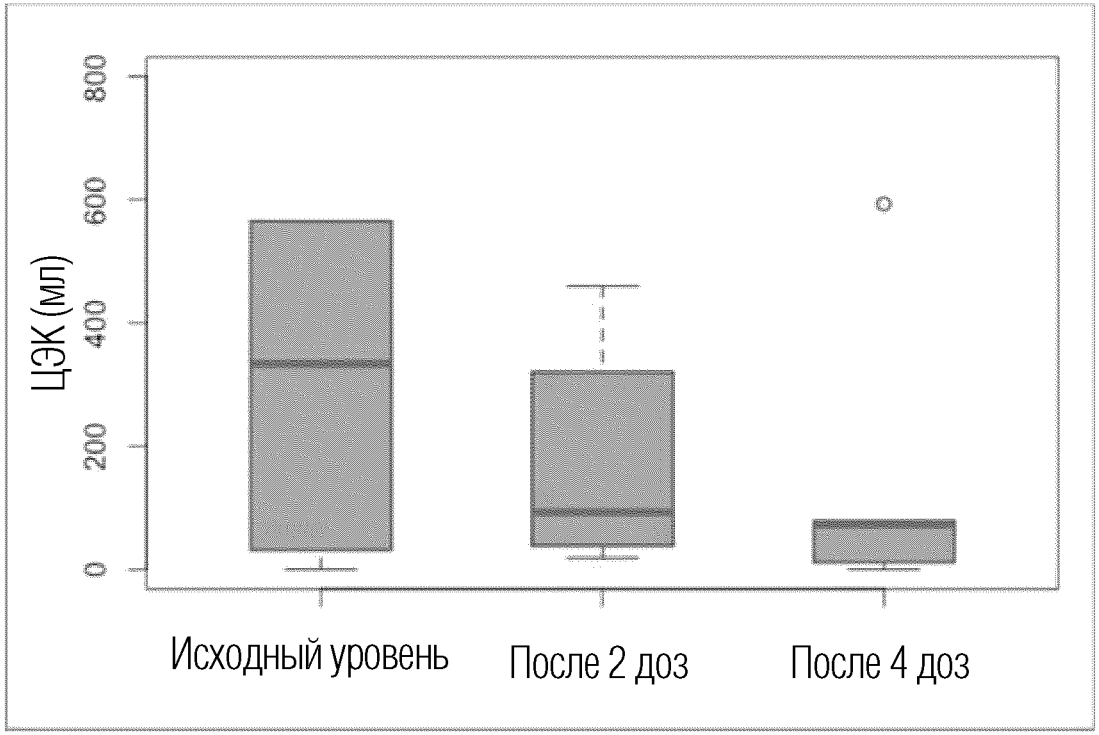
ФИГ. 41C



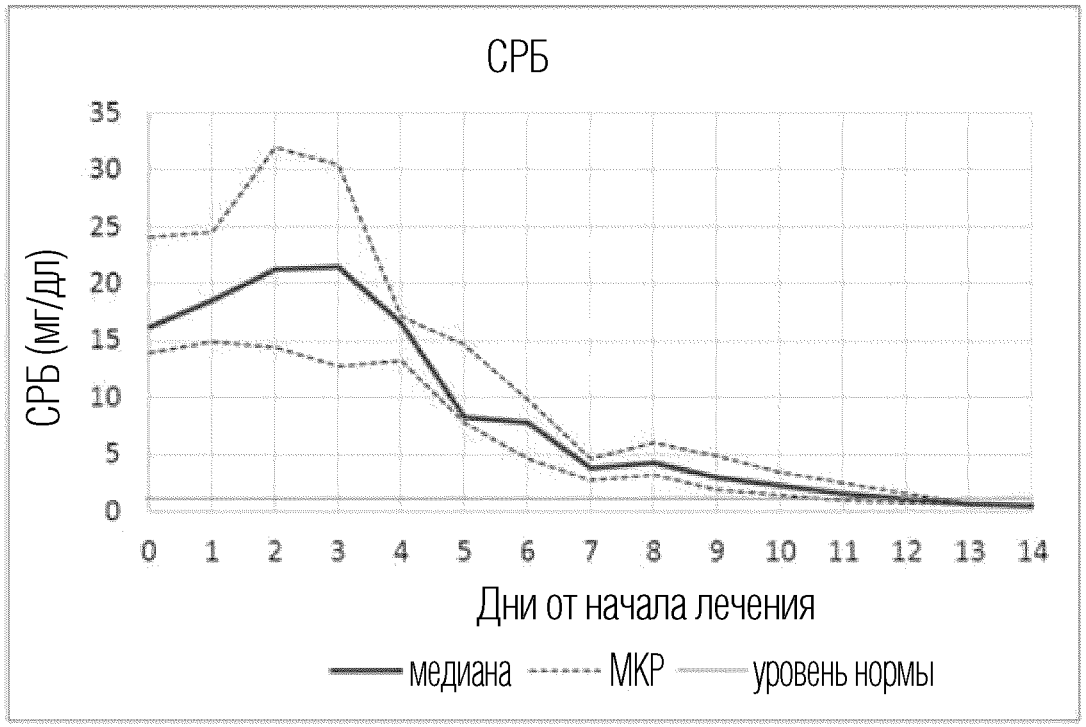
ФИГ. 41D


ЦЭК (мл)
0
200
400
600
800
здоровые (n=6)
дополнительно исследо-
вание COVID (n=33)

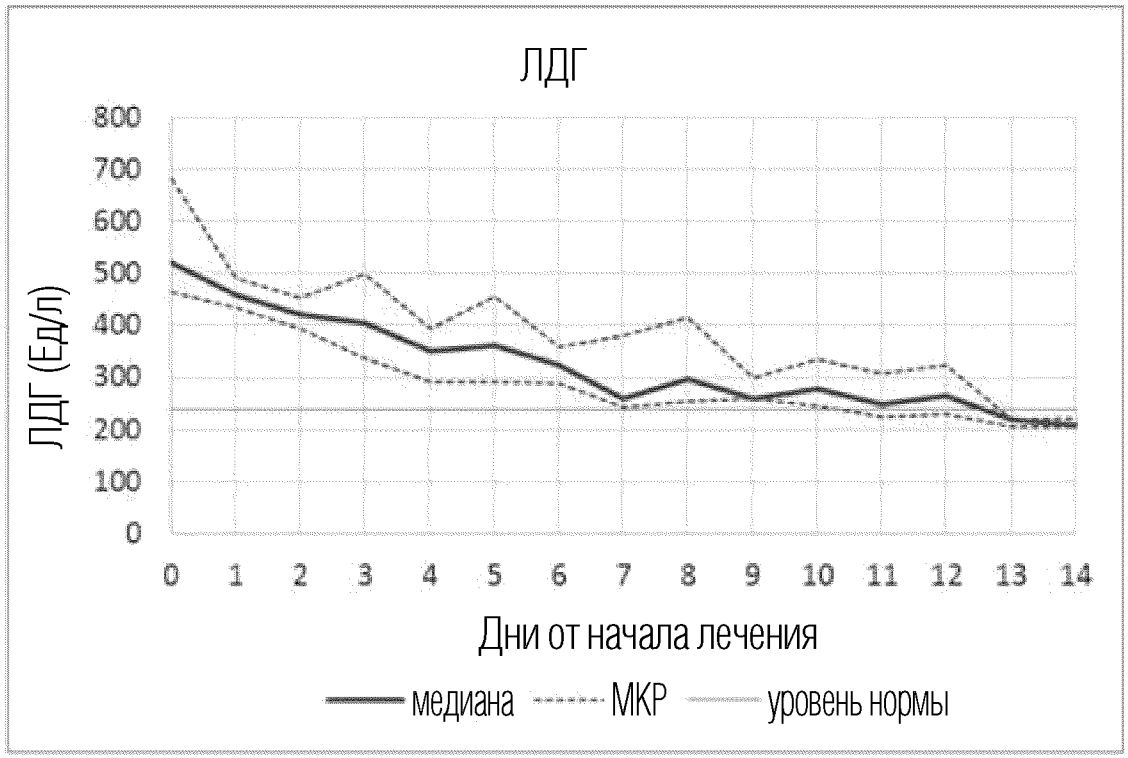
ФИГ. 42A


ЦЭК (мл)
0
200
400
600
800
Исходный уровень
После 2 доз
После 4 доз

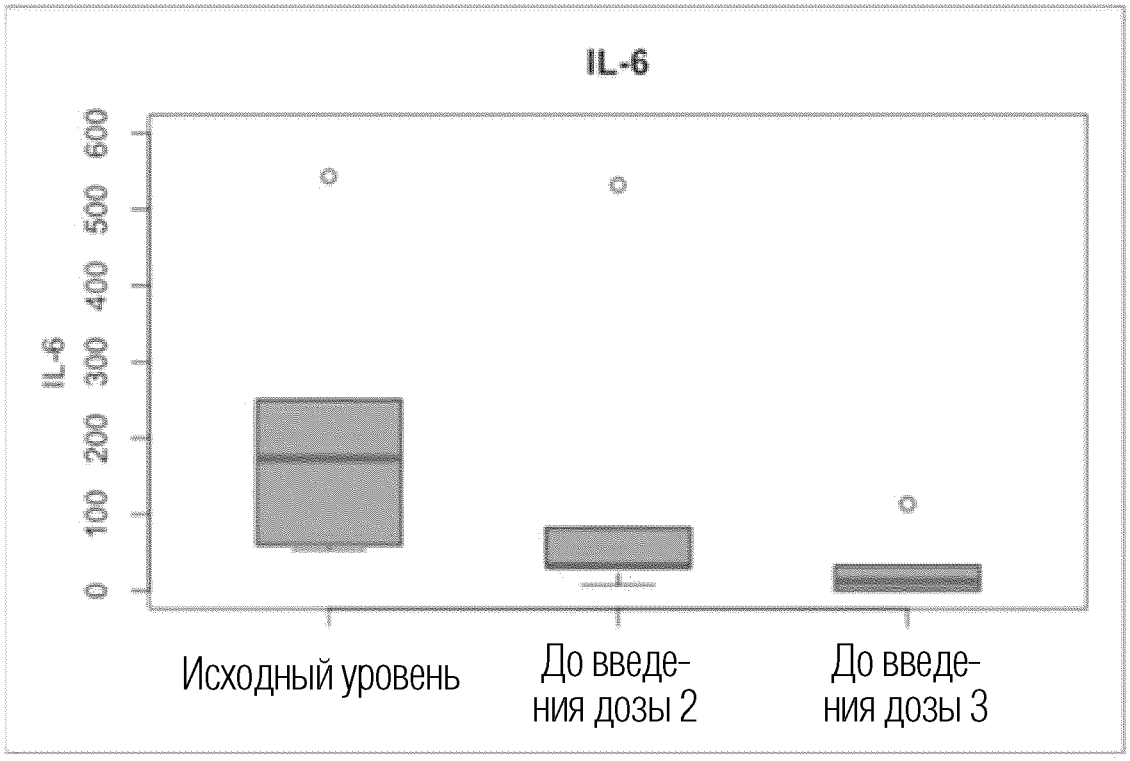
ФИГ. 42B


СРБ
СРБ (мг/дл)
35
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Дни от начала лечения
медиана
МКР
уровень нормы

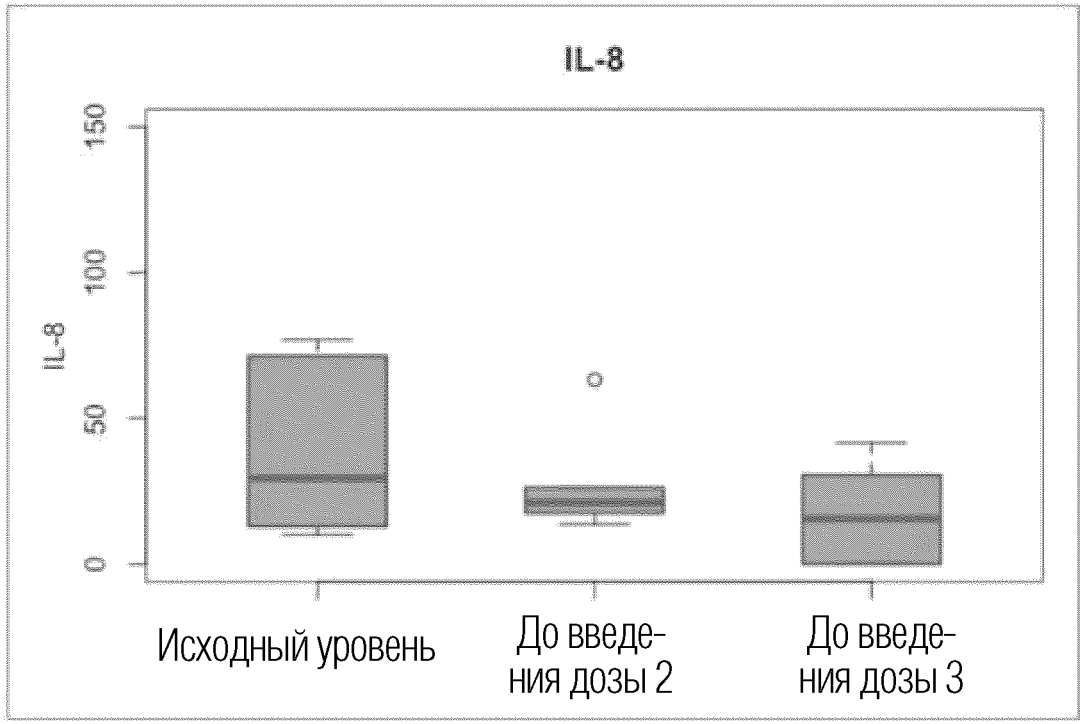
ФИГ. 43


ЛДГ
ЛДГ (Ед/л)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Дни от начала лечения
медиана
МКР
уровень нормы

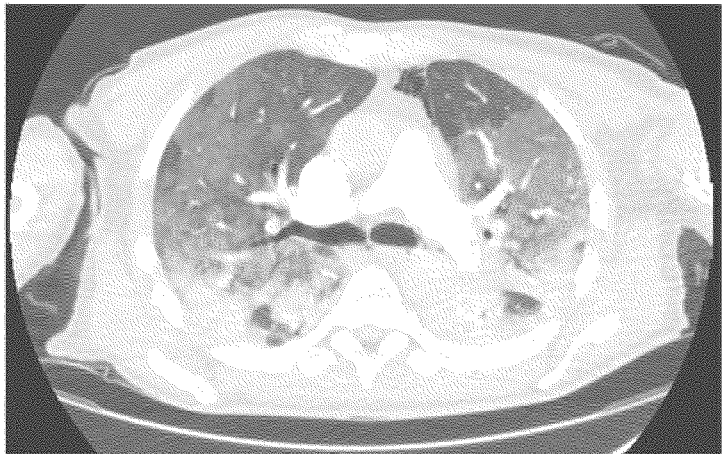
ФИГ. 44


IL-6
IL-6
0
100
200
300
400
500
600
Исходный уровень
До введе-
ния дозы 2
До введе-
ния дозы 3

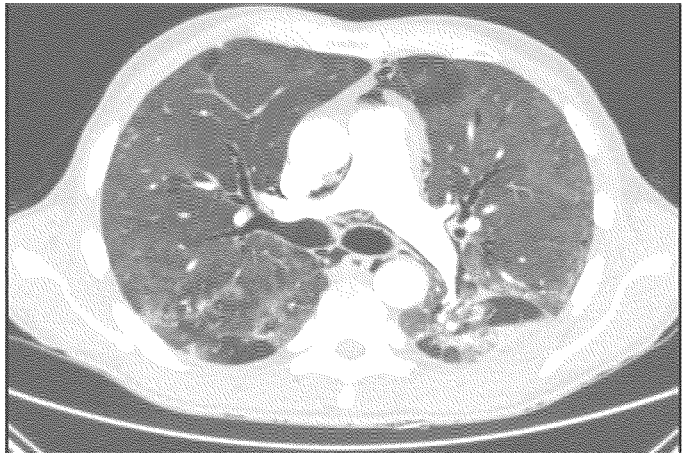
ФИГ. 45


IL-8
IL-8
0
50
100
150
Исходный уровень
До введе-
ния дозы 2
До введе-
ния дозы 3

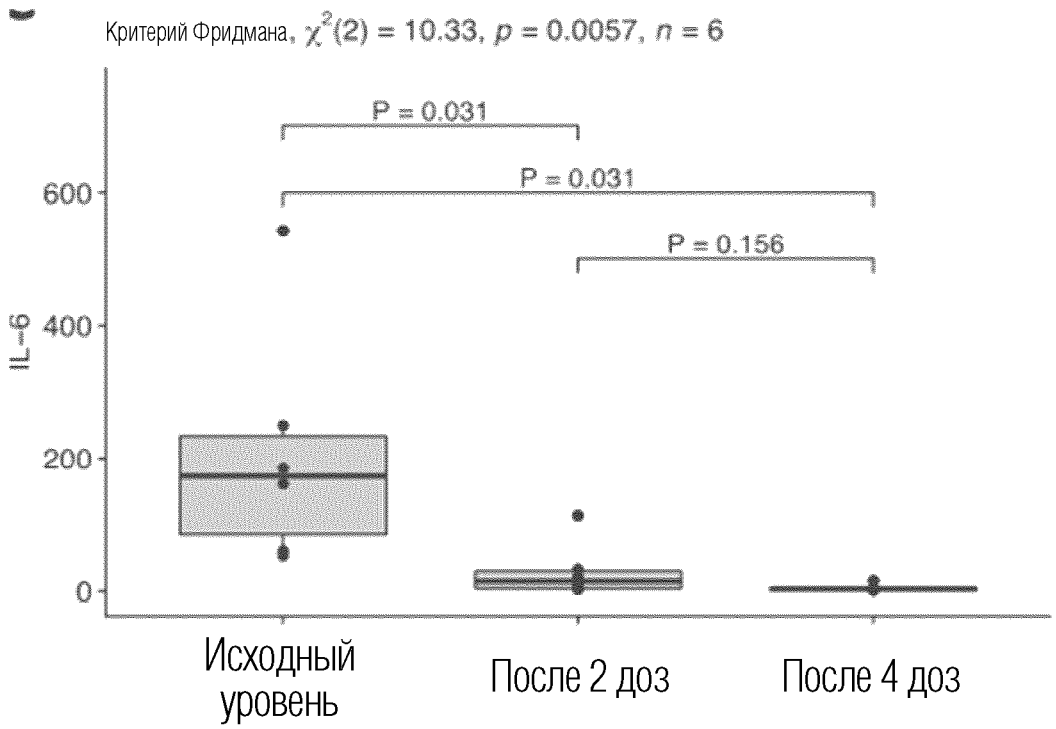
ФИГ. 46



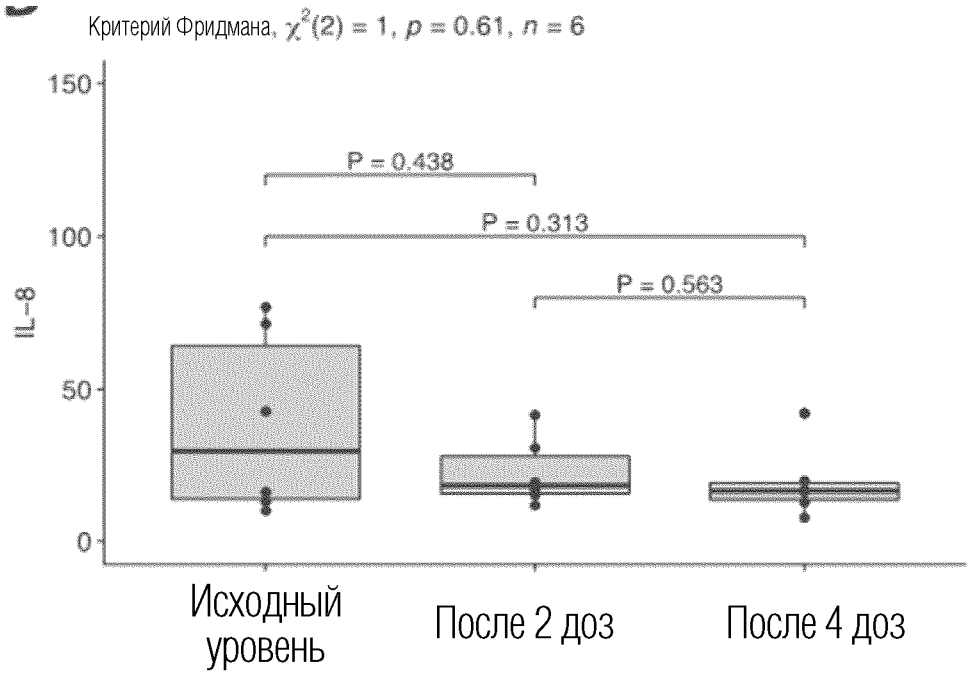
ФИГ. 47A



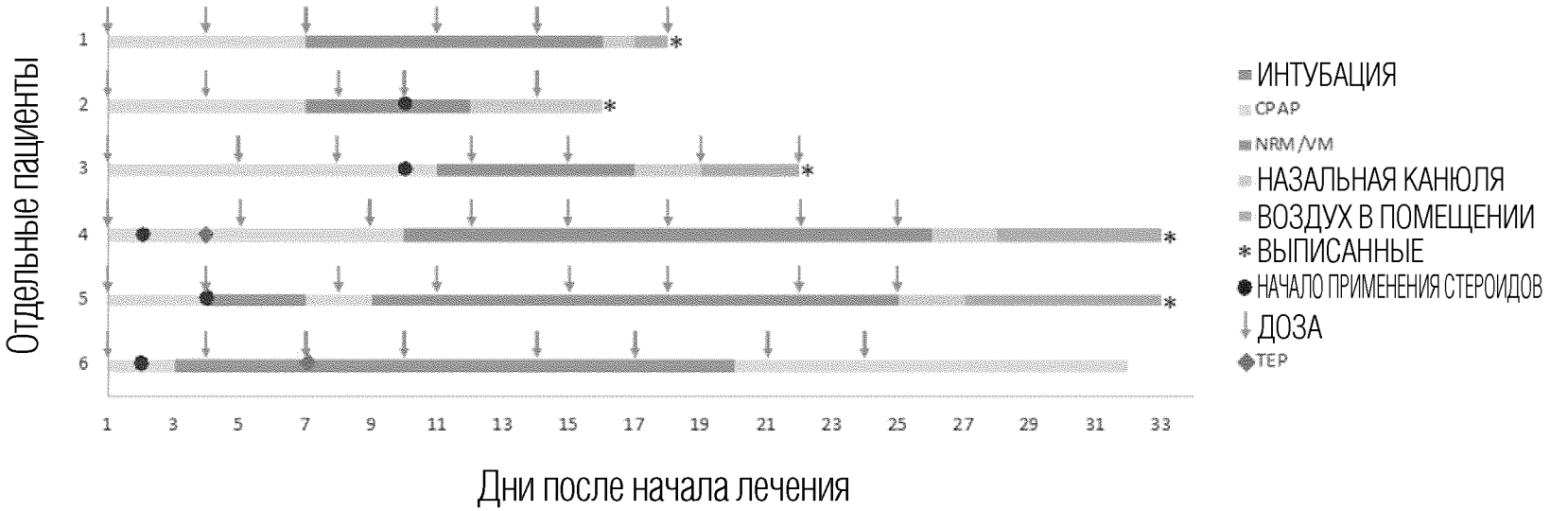
ФИГ. 47B


Критерий Фридмана, $\chi^2(2) = 10.33$, $p = 0.0057$, $n = 6$
P = 0.031
P = 0.031
P = 0.156
600
400
200
0
IL-6
Исходный уровень
После 2 доз
После 4 доз

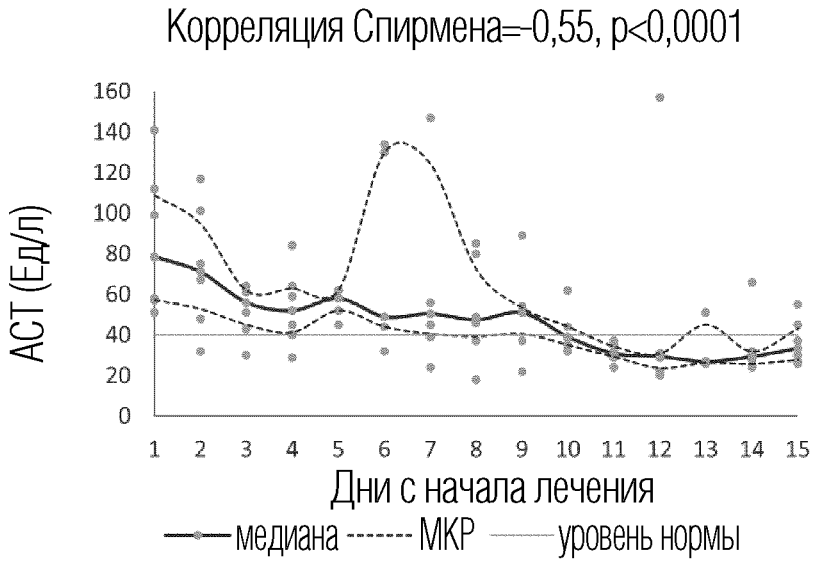
ФИГ. 48


Критерий Фридмана, $\chi^2(2) = 1$, $p = 0.61$, $n = 6$
IL-8
150
100
50
0
P = 0.438
P = 0.313
P = 0.563
Исходный уровень
После 2 доз
После 4 доз

ФИГ. 49


Отдельные пациенты
1
2
3
4
5
6
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
Дни после начала лечения
ИНТУБАЦИЯ
CPAP
NRM /VM
НАЗАЛЬНАЯ КАНЮЛЯ
ВОЗДУХ В ПОМЕЩЕНИИ
ВЫПИСАННЫЕ
НАЧАЛО ПРИМЕНЕНИЯ СТЕРОИДОВ
ДОЗА
ТЕР

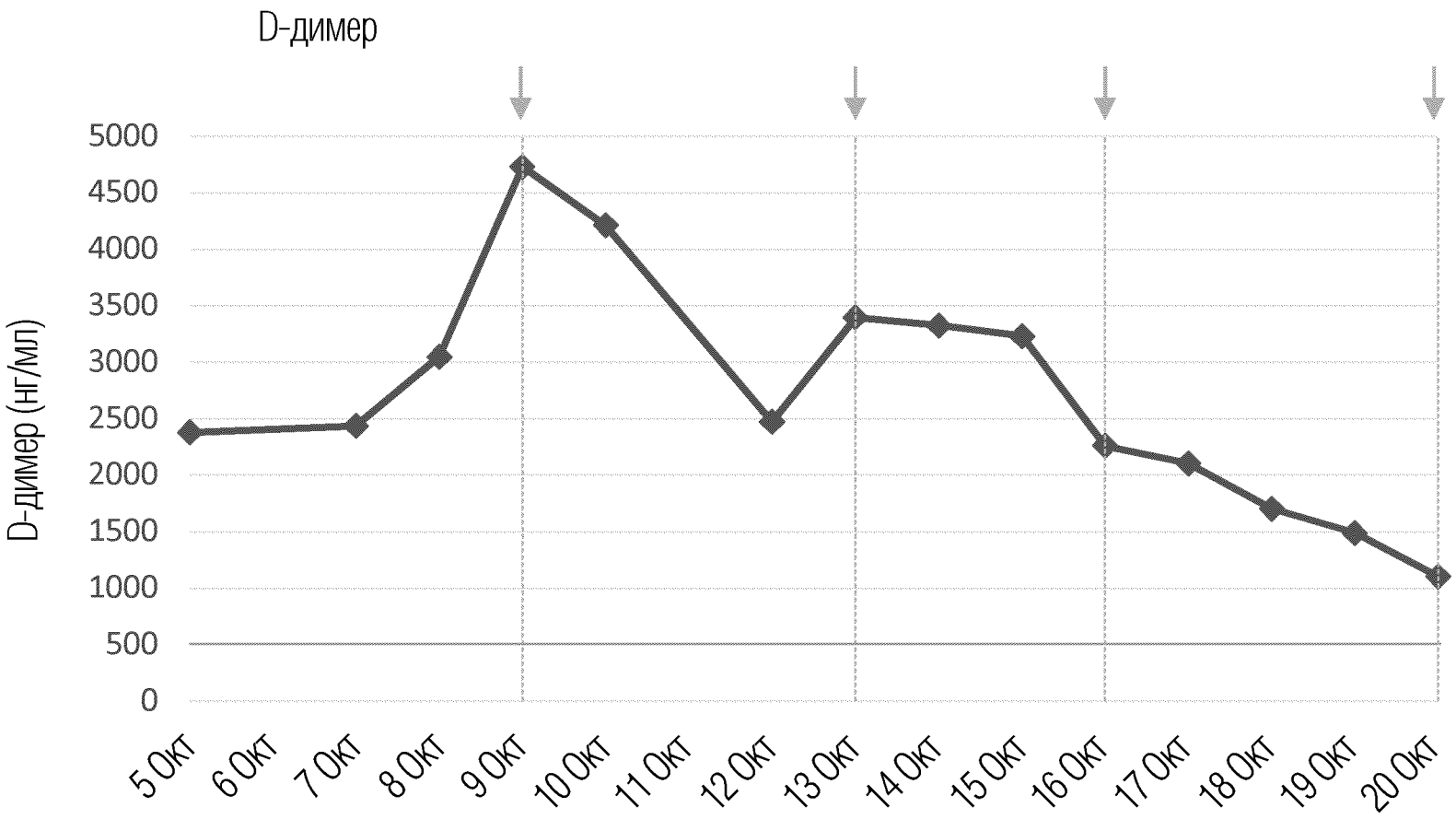
ФИГ. 50


Корреляция Спирмена=-0,55, p<0,0001
АСТ (Ед/л)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Дни с начала лечения
медиана
МКР
уровень нормы

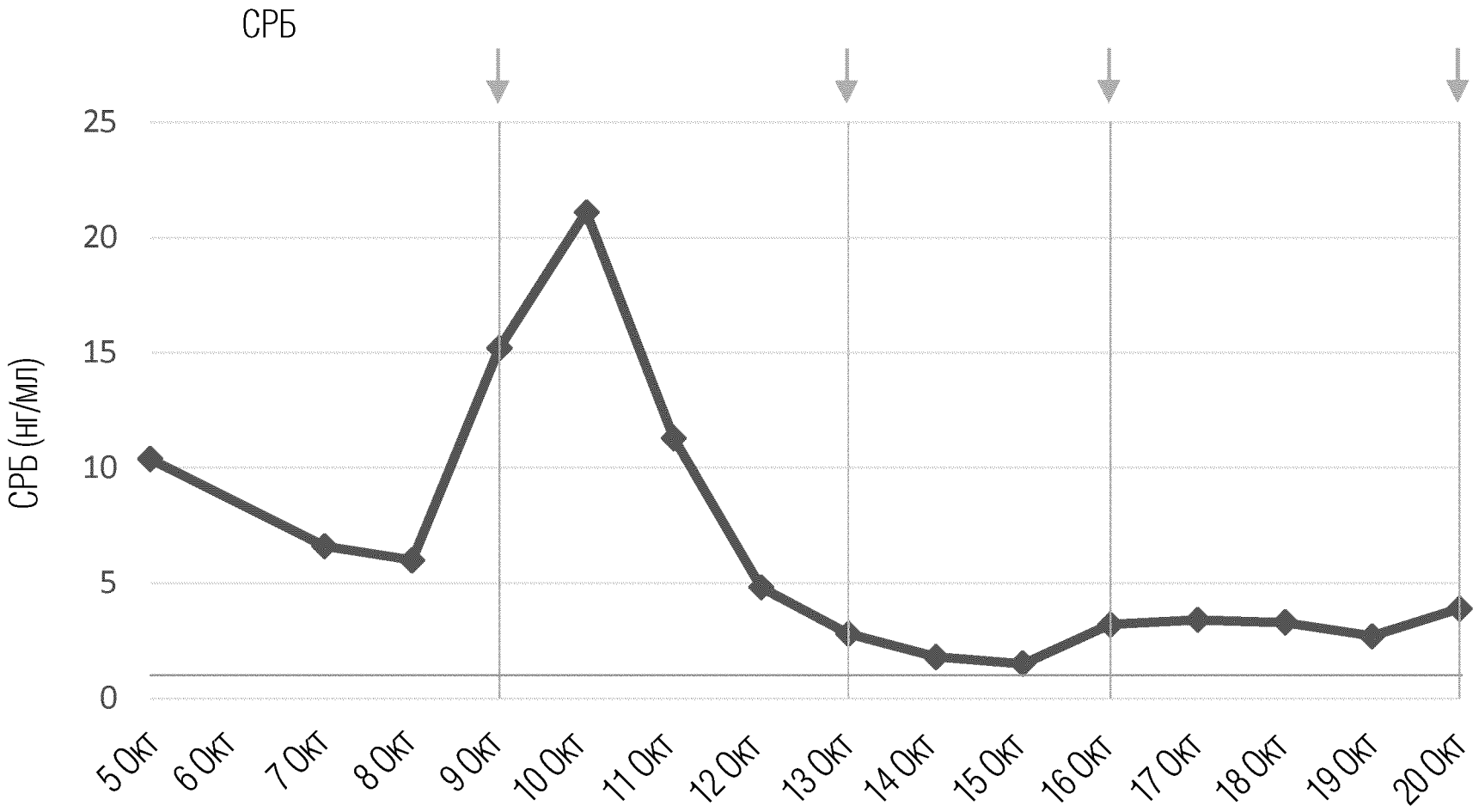
ФИГ. 51А


100000
10000
1000
500
100
D-димер (нг/мл)
#3
#4
#5
#6
Стероид
0
5
10
15
20
25
30
Дни с начала включения в исследование

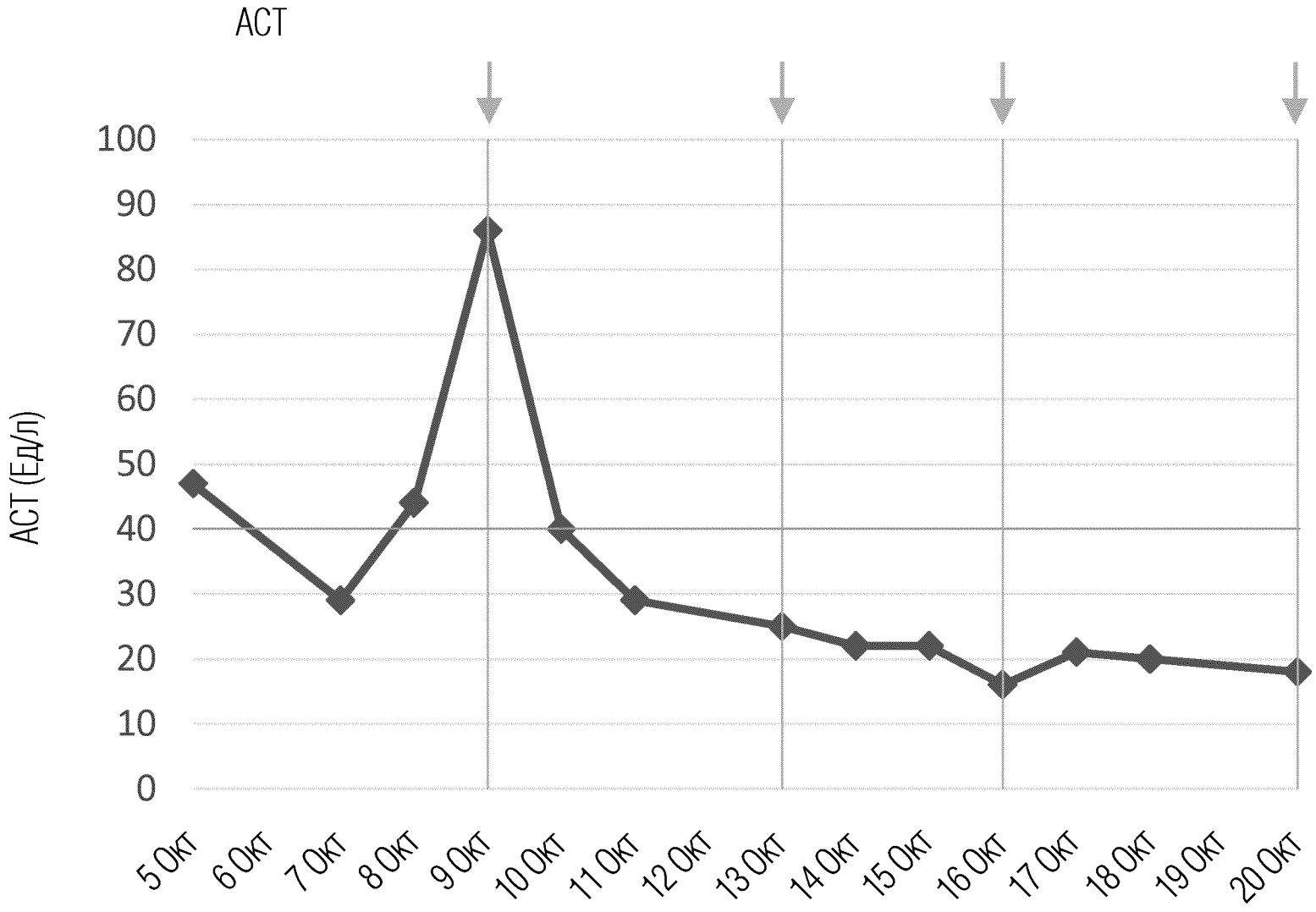
ФИГ. 51B


D-димер
D-димер (нг/мл)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5 Окт
6 Окт
7 Окт
8 Окт
9 Окт
10 Окт
11 Окт
12 Окт
13 Окт
14 Окт
15 Окт
16 Окт
17 Окт
18 Окт
19 Окт
20 Окт

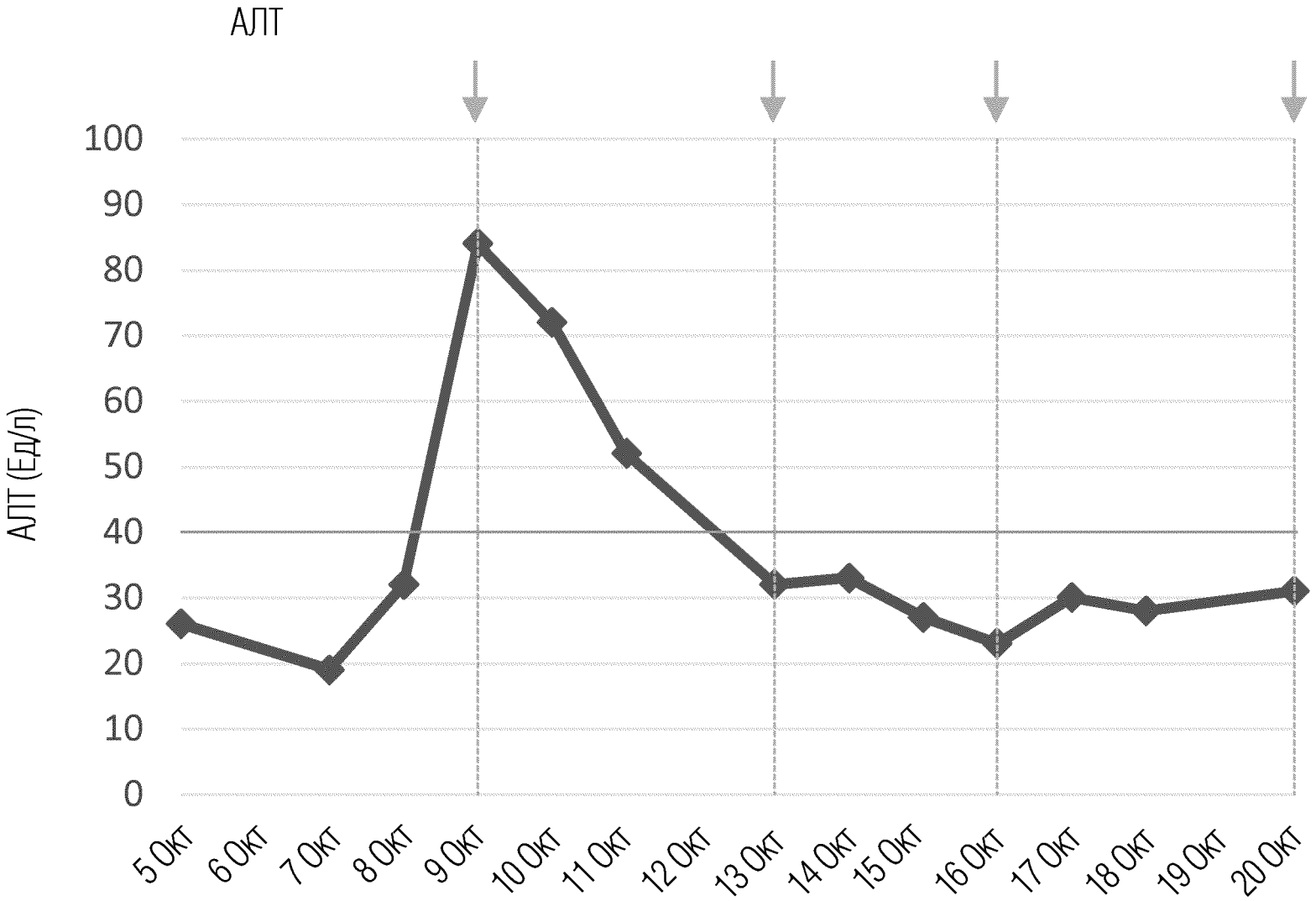
ФИГ. 52А


СРБ
СРБ (нг/мл)
25
20
15
10
5
0
5 Окт
6 Окт
7 Окт
8 Окт
9 Окт
10 Окт
11 Окт
12 Окт
13 Окт
14 Окт
15 Окт
16 Окт
17 Окт
18 Окт
19 Окт
20 Окт

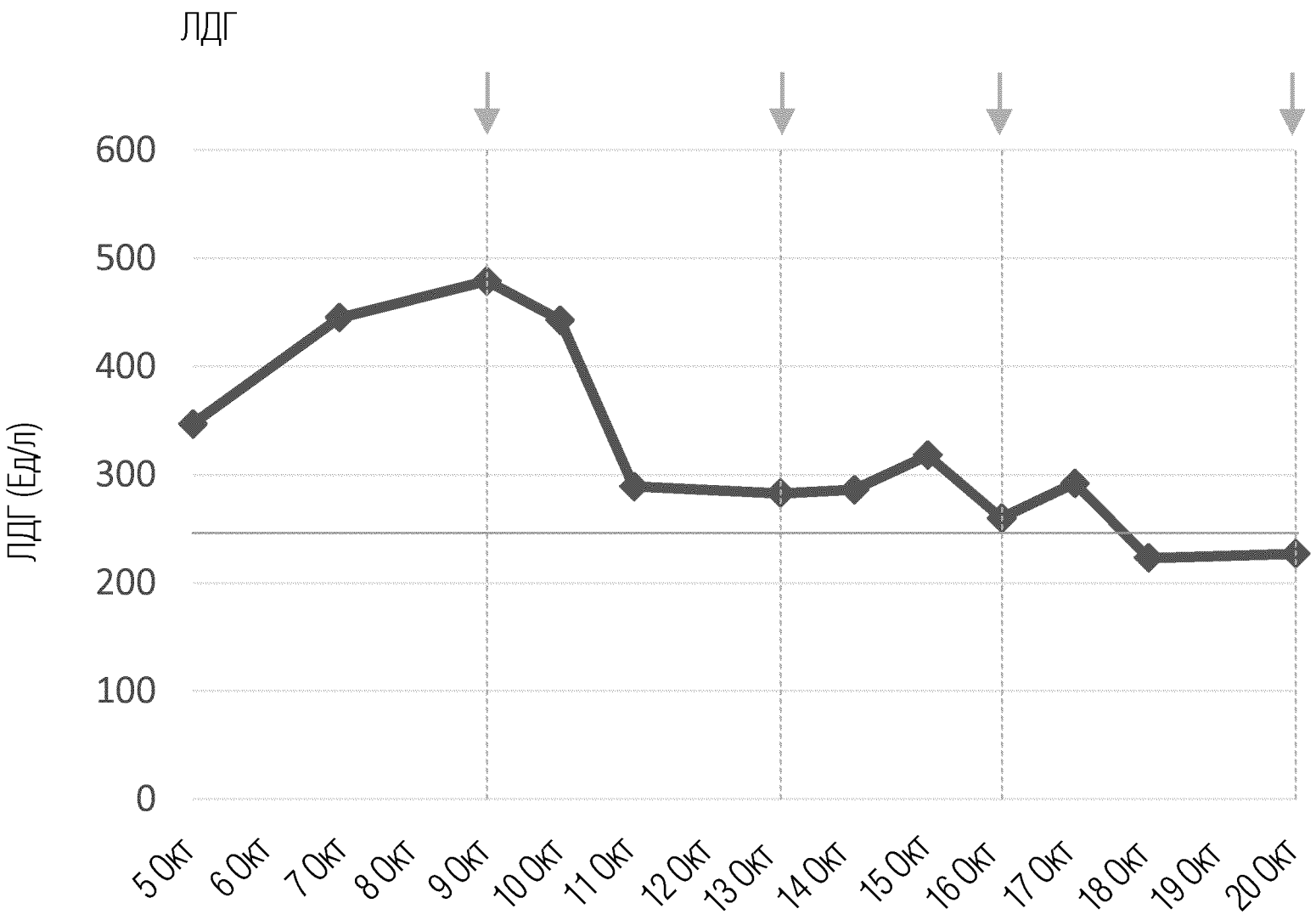
ФИГ. 52В


АСТ
АСТ (Ед/л)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5 Окт
6 Окт
7 Окт
8 Окт
9 Окт
10 Окт
11 Окт
12 Окт
13 Окт
14 Окт
15 Окт
16 Окт
17 Окт
18 Окт
19 Окт
20 Окт

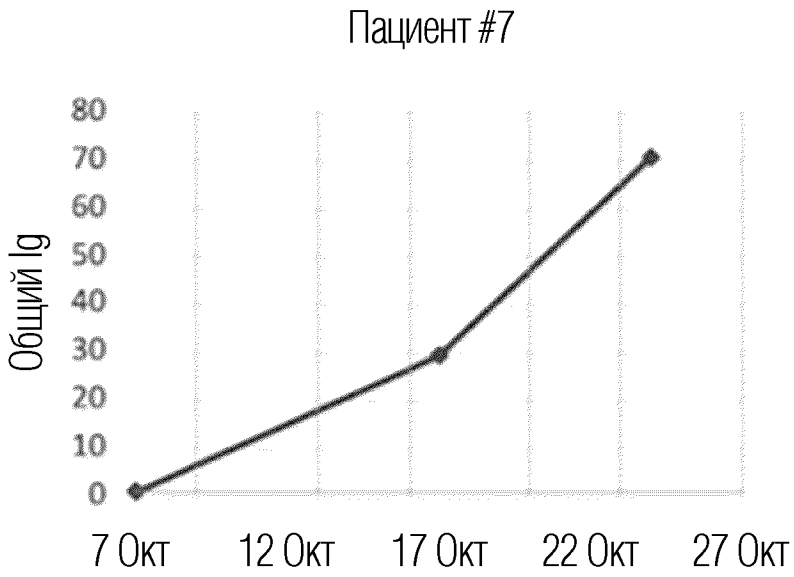
ФИГ. 52С


АЛТ
АЛТ (Ед/л)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5 Окт
6 Окт
7 Окт
8 Окт
9 Окт
10 Окт
11 Окт
12 Окт
13 Окт
14 Окт
15 Окт
16 Окт
17 Окт
18 Окт
19 Окт
20 Окт

ФИГ. 52D

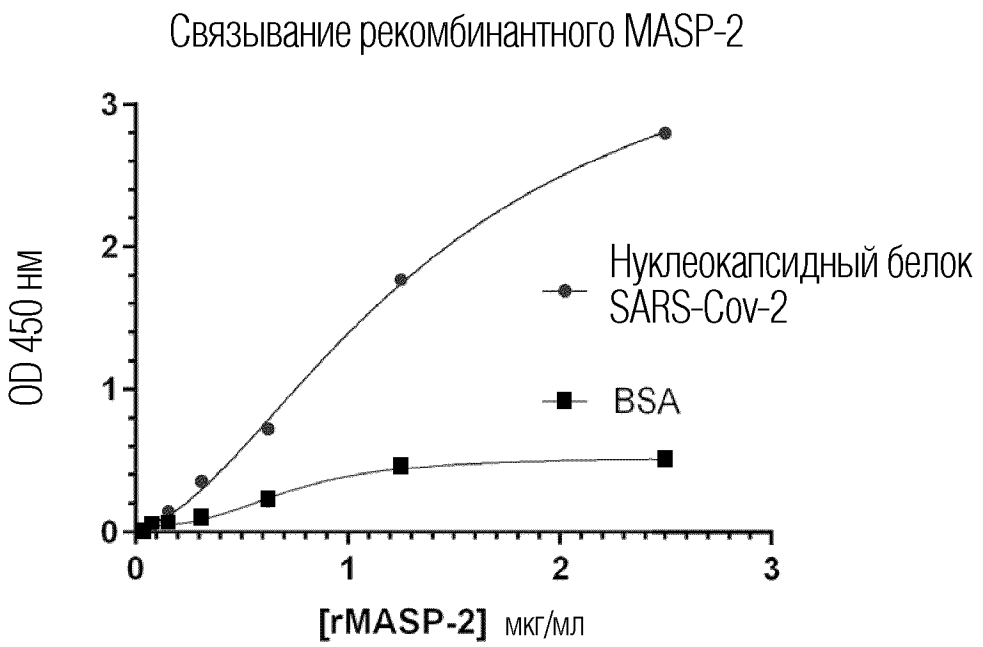

ЛДГ
ЛДГ (Ед/л)
600
500
400
300
200
100
0
5 Окт
6 Окт
7 Окт
8 Окт
9 Окт
10 Окт
11 Окт
12 Окт
13 Окт
14 Окт
15 Окт
16 Окт
17 Окт
18 Окт
19 Окт
20 Окт

ФИГ. 52E

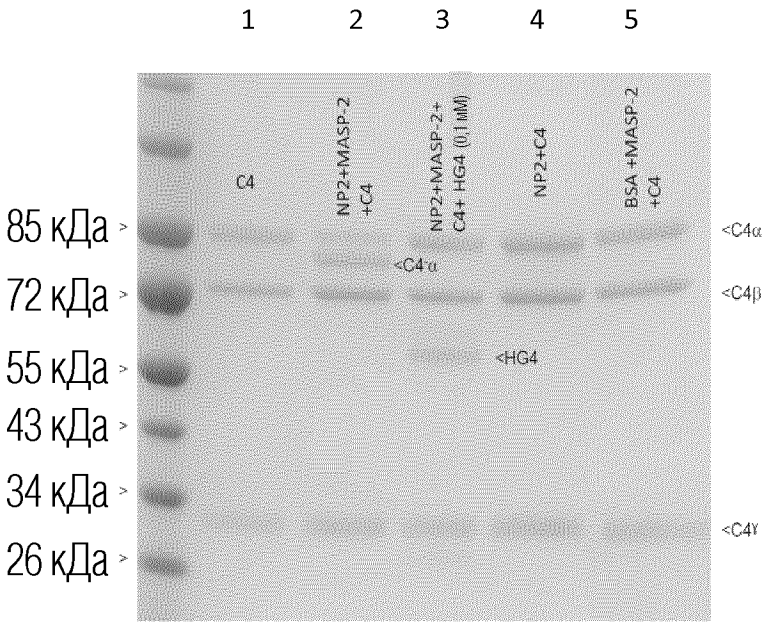

Пациент #7
Общий Ig
80
70
60
50
40
30
20
10
0
7 Окт
12 Окт
17 Окт
22 Окт
27 Окт

ФИГ. 53

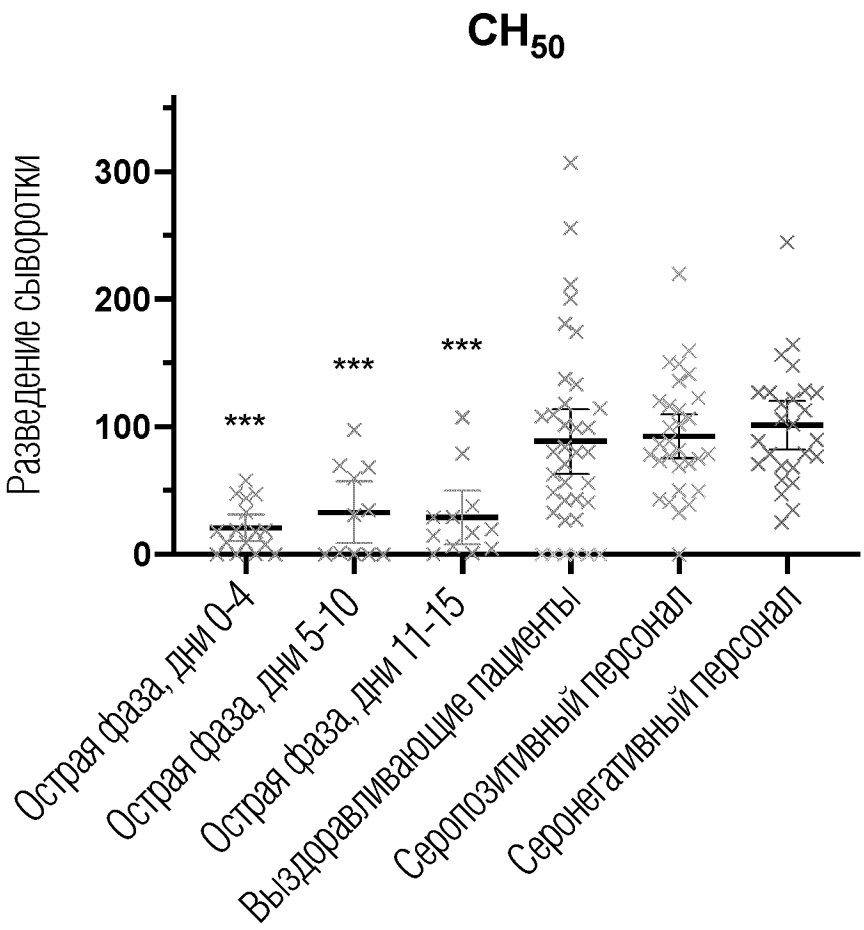
ФИГ. 54


Связывание рекомбинантного MASP-2
OD 450 нм
0
1
2
3
0
1
2
3
[rMASP-2] мкг/мл
Нуклеокапсидный белок SARS-Cov-2
BSA

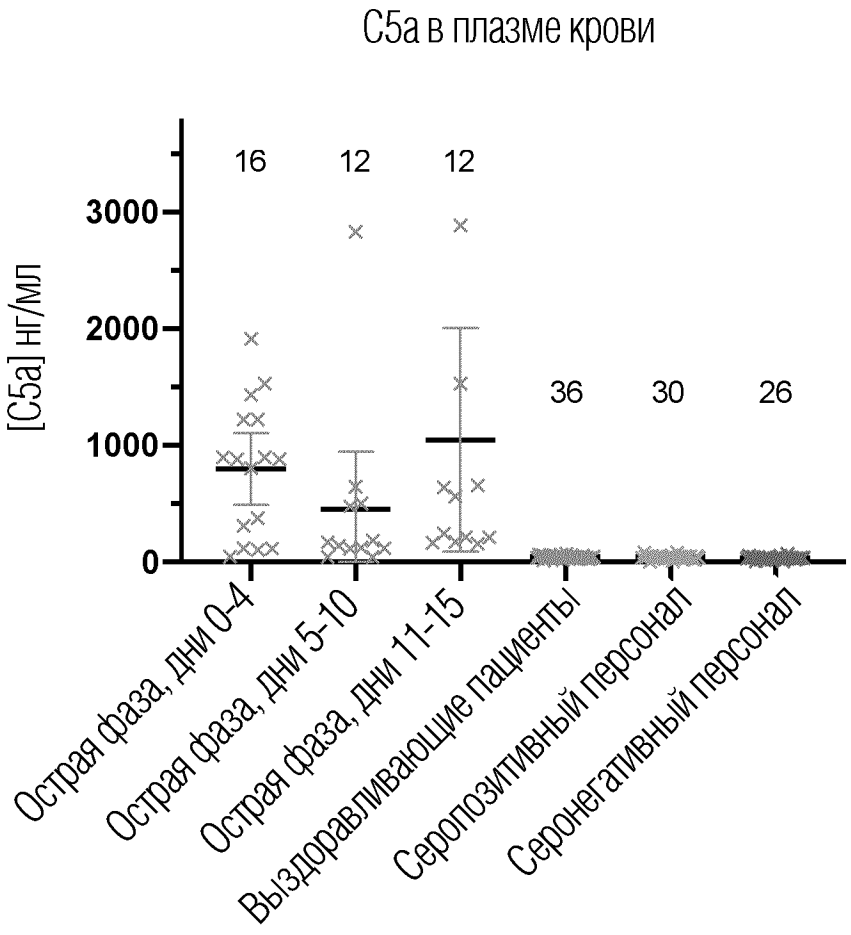
ФИГ. 55


1
2
3
4
5
C4
NP2+MASP-2 +C4
NP2+MASP-2+ C4+ HG4 (0,1 мМ)
NP2+C4
BSA +MASP-2 +C4
85 кДа
72 кДа
55 кДа
43 кДа
34 кДа
26 кДа
<C4α
<C4β
<C4γ
<HG4

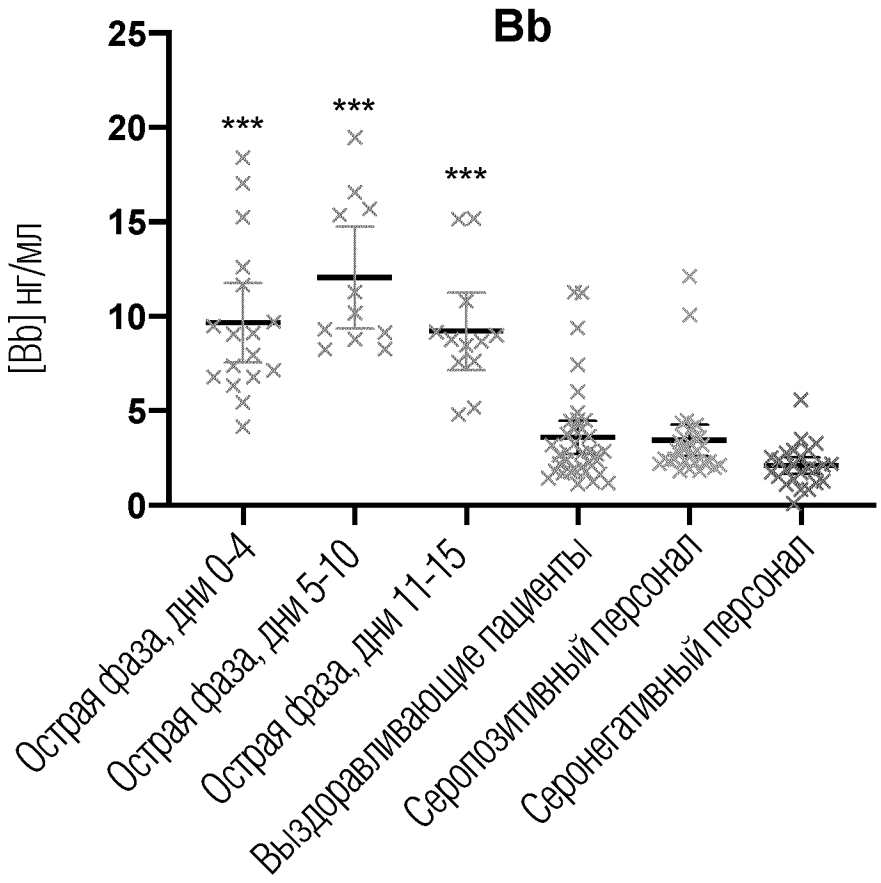
ФИГ. 56


CH50
Разведение сыворотки
300
200
100
0
***
***
***
Острая фаза, дни 0-4
Острая фаза, дни 5-10
Острая фаза, дни 11-15
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

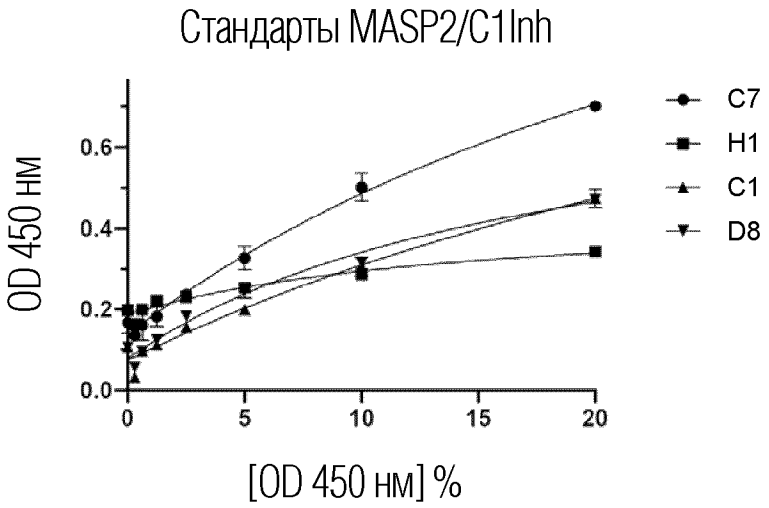
ФИГ. 57


C5a в плазме крови
[C5a] нг/мл
3000
2000
1000
0
16
12
12
36
30
26
Острая фаза, дни 0-4
Острая фаза, дни 5-10
Острая фаза, дни 11-15
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

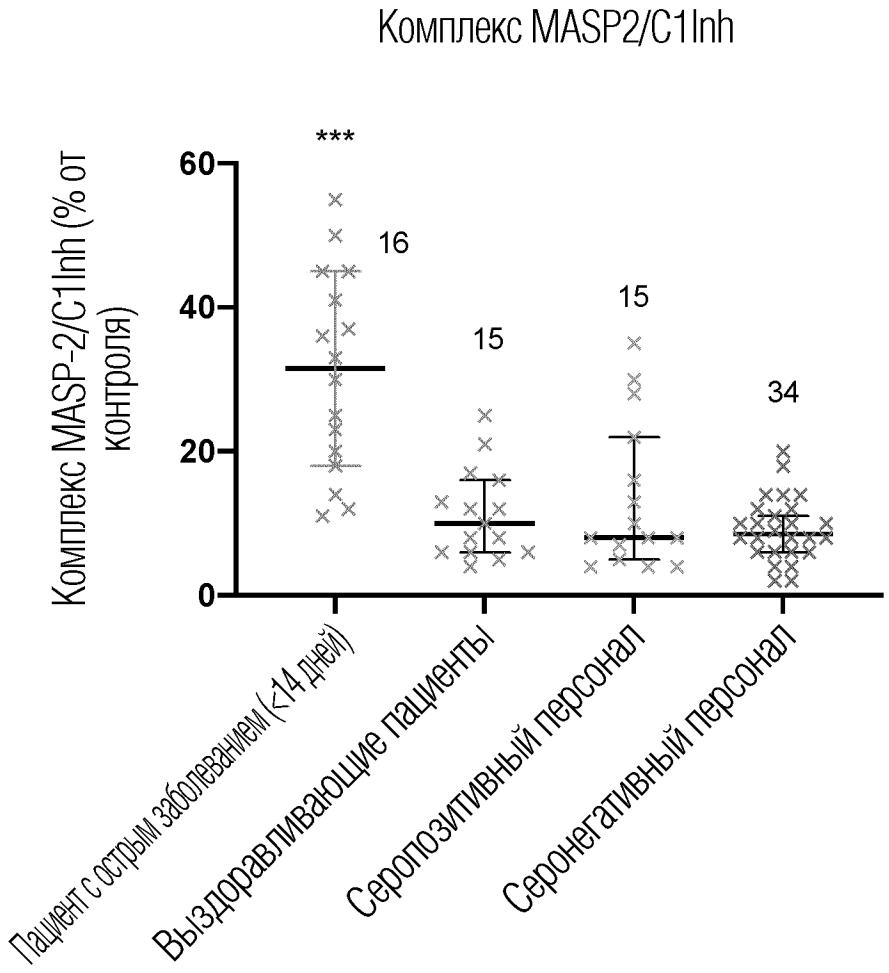
ФИГ. 58


Bb
[Bb] нг/мл
25
20
15
10
5
0
***
***
***
Острая фаза, дни 0-4
Острая фаза, дни 5-10
Острая фаза, дни 11-15
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

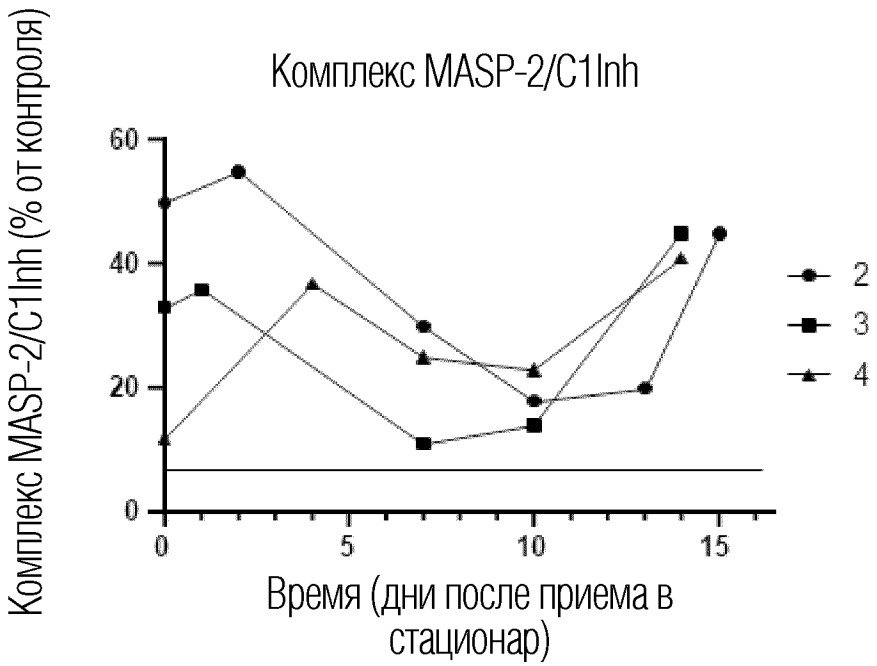
ФИГ. 59

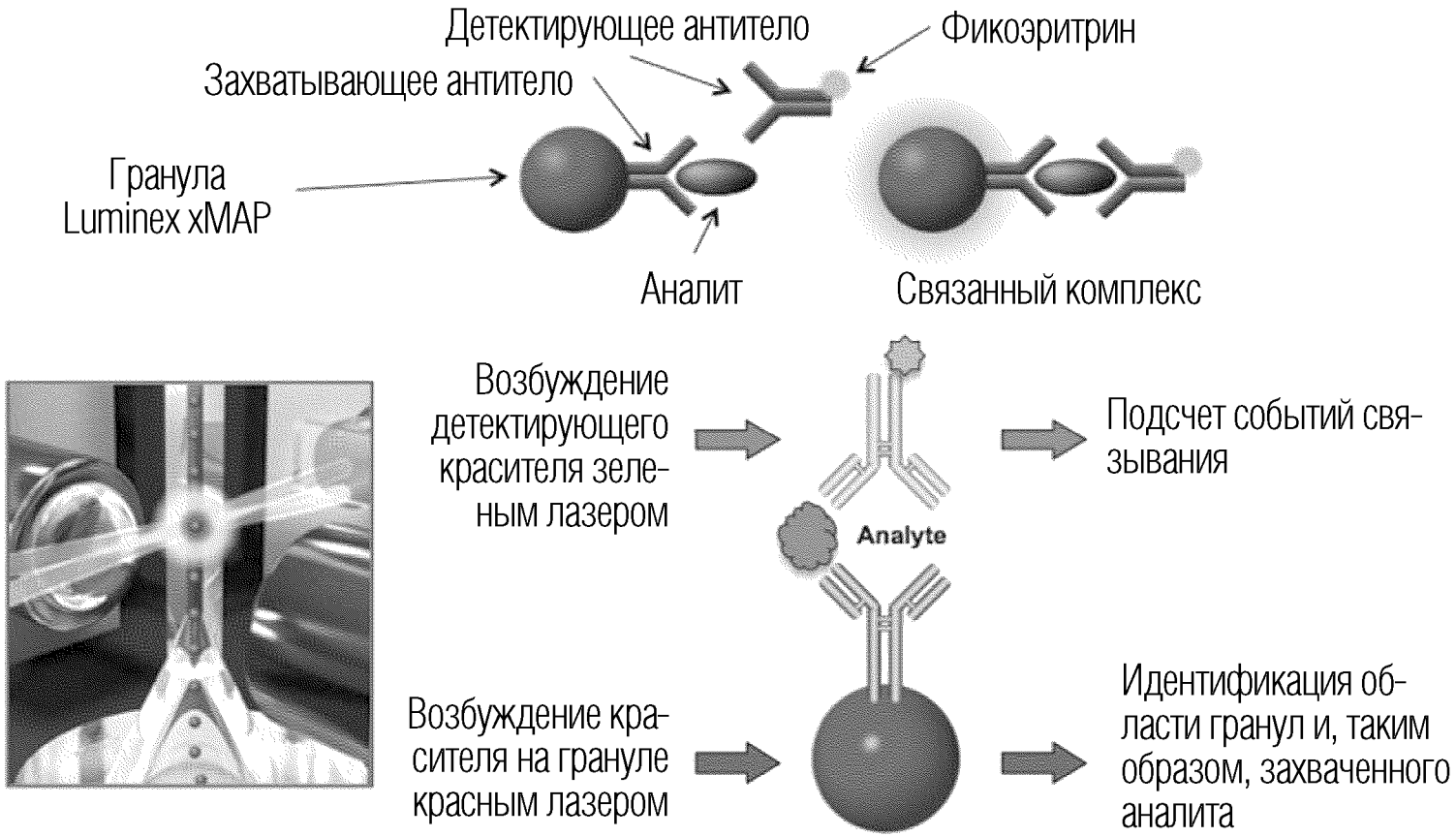

Стандарты MASP2/C1Inh
OD 450 нм
0.0
0.2
0.4
0.6
0
5
10
15
20
[OD 450 нм] %
C7
H1
C1
D8

ФИГ. 60


Комплекс MASP2/C1Inh
Комплекс MASP-2/C1Inh (% от контроля)
60
40
20
0
***
16
15
15
34
Пациент с острым заболеванием (<14 дней)
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

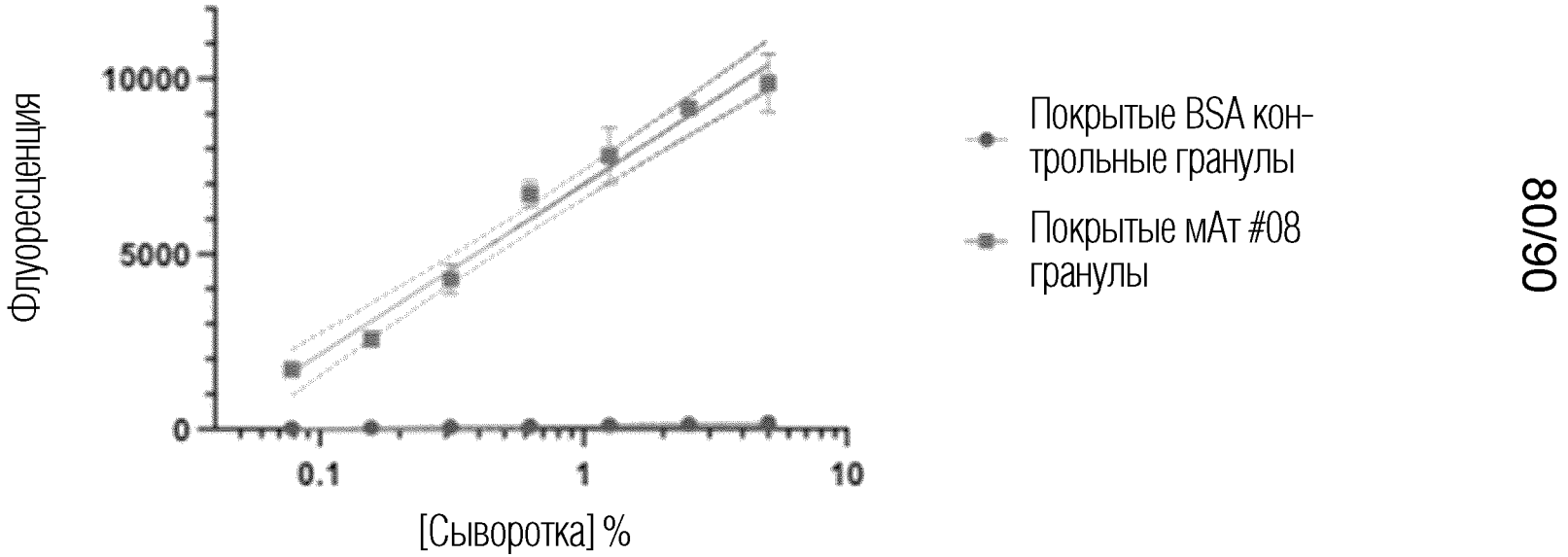
ФИГ. 61


Комплекс MASP-2/C1Inh
Комплекс MASP-2/C1Inh (% от контроля)
60
40
20
0
0
5
10
15
Время (дни после приема в стационар)
2
3
4

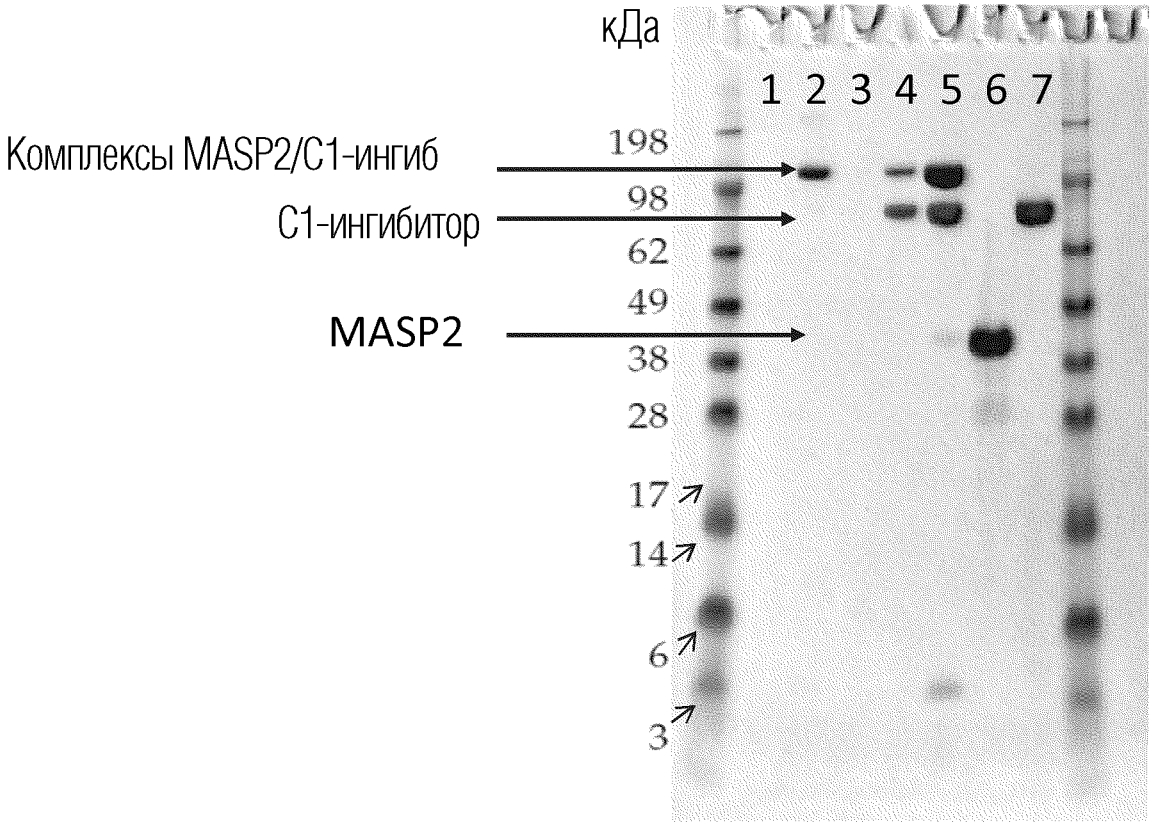

Детектирующее антитело
Фикоэритрин
Захватывающее антитело
Гранула
Luminex xMAP
Аналит
Связанный комплекс
Возбуждение детектирующего красителя зеленым лазером
Analyte
Подсчет событий связывания
Возбуждение красителя на грануле красным лазером
Идентификация области гранул и, таким образом, захваченного аналита

ФИГ. 62

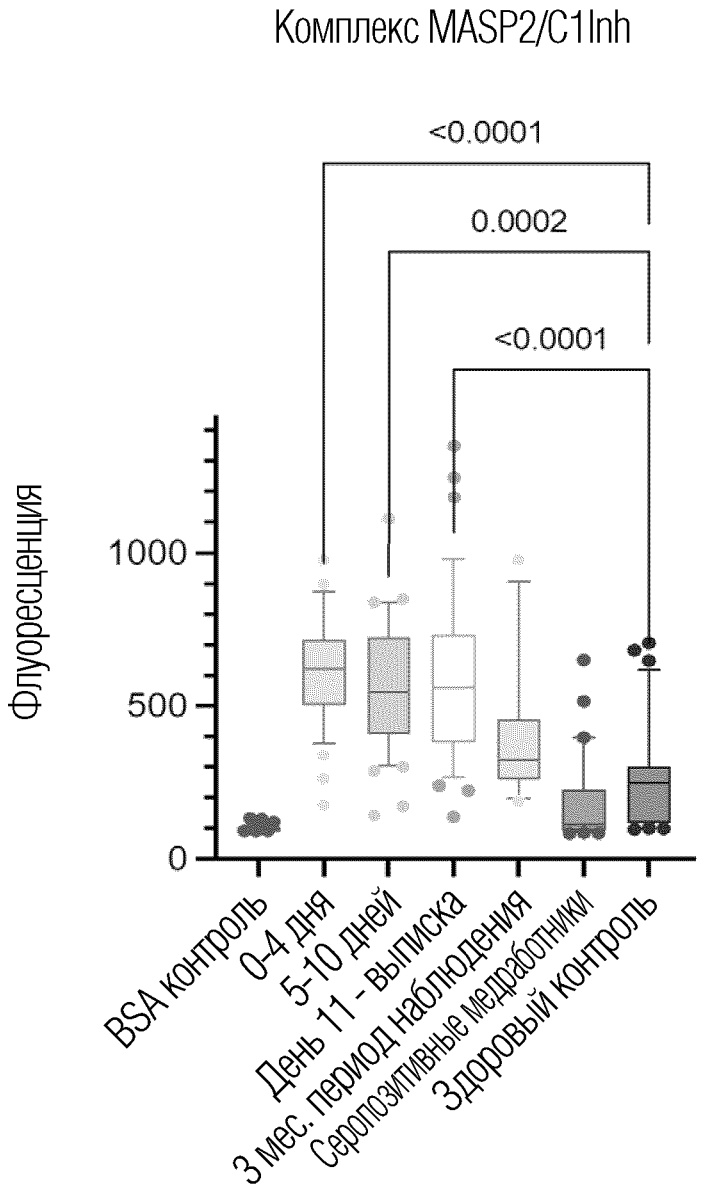
Анализ комплекса MASP2/C1Inh, калибровка с использованием смешанной плазмы пациентов с острым Covid-19



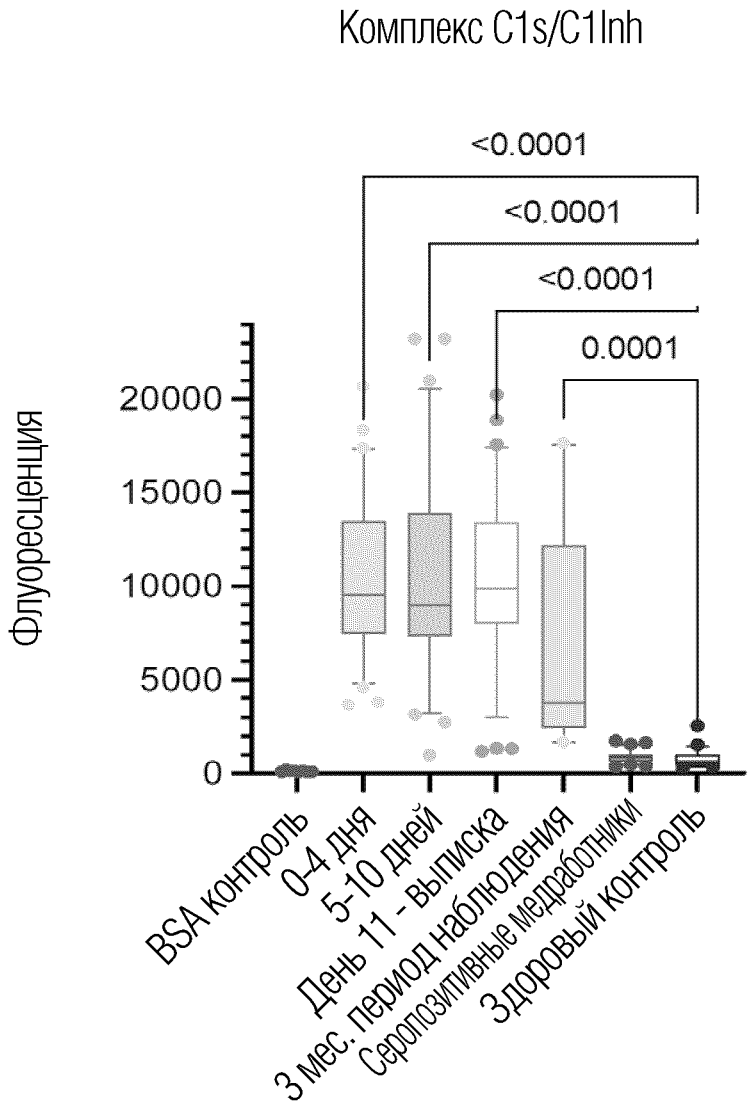
ФИГ. 63


кДа
1 2 3 4 5 6 7
Комплексы MASP2/C1-ингиб
C1-ингибитор
MASP2
198
98
62
49
38
28
17
14
6
3

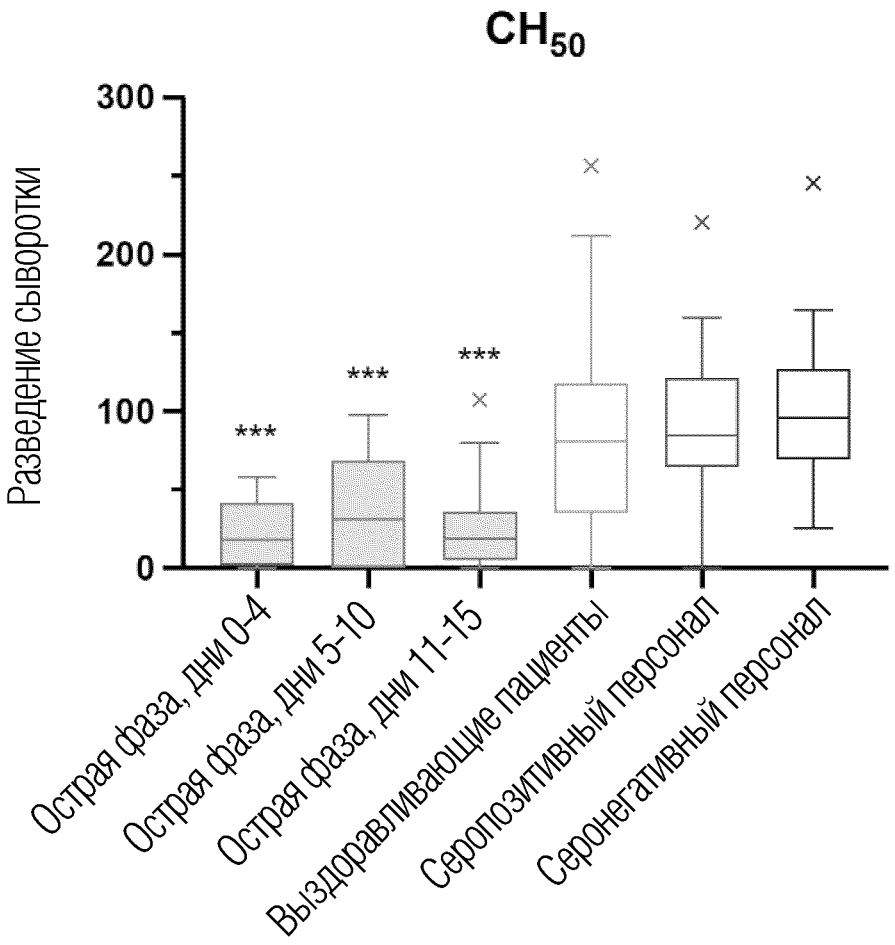
ФИГ. 64


Комплекс MASP2/C1Inh
<0.0001
0.0002
<0.0001
Флуоресценция
1000
500
0
BSA контроль
0-4 дня
5-10 дней
День 11 - выписка
3 мес. период наблюдения
Серопозитивные медработники
Здоровый контроль

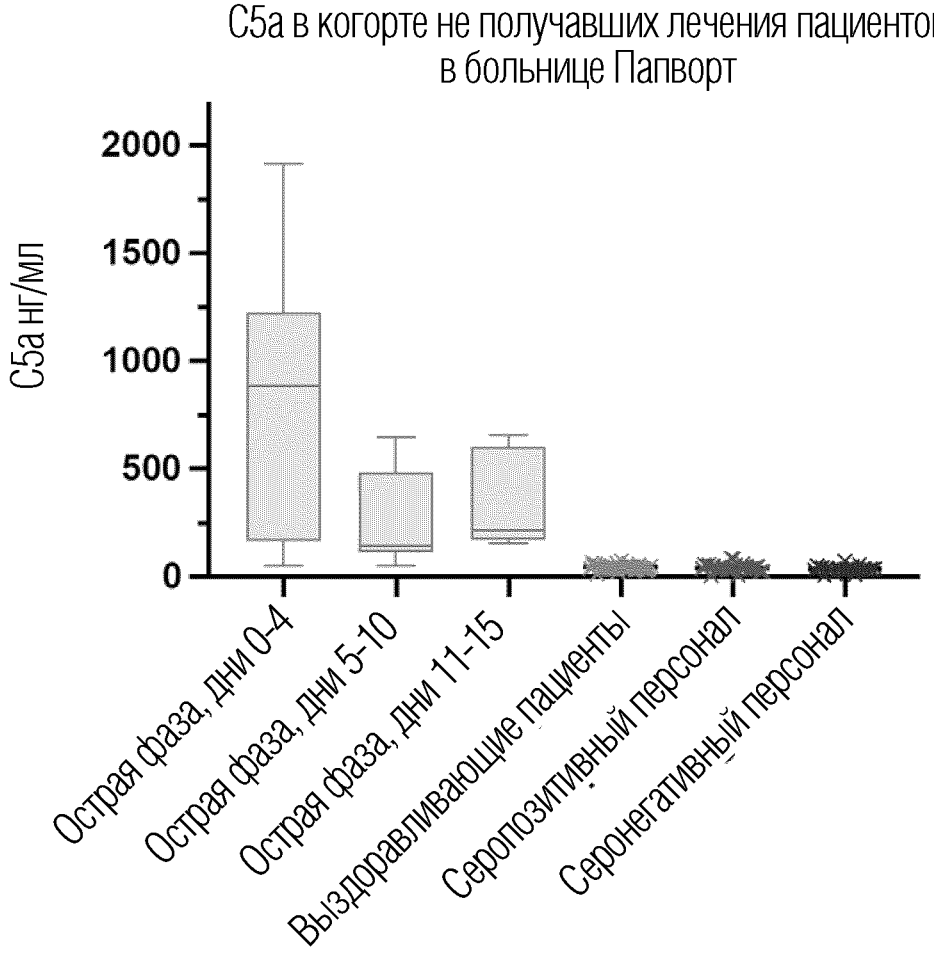
ФИГ. 65


Комплекс C1s/C1Inh
<0.0001
<0.0001
<0.0001
0.0001
Флуоресценция
20000
15000
10000
5000
0
BSA контроль
0-4 дня
5-10 дней
День 11 - выписка
3 мес. период наблюдения
Серопозитивные медработники
Здоровый контроль

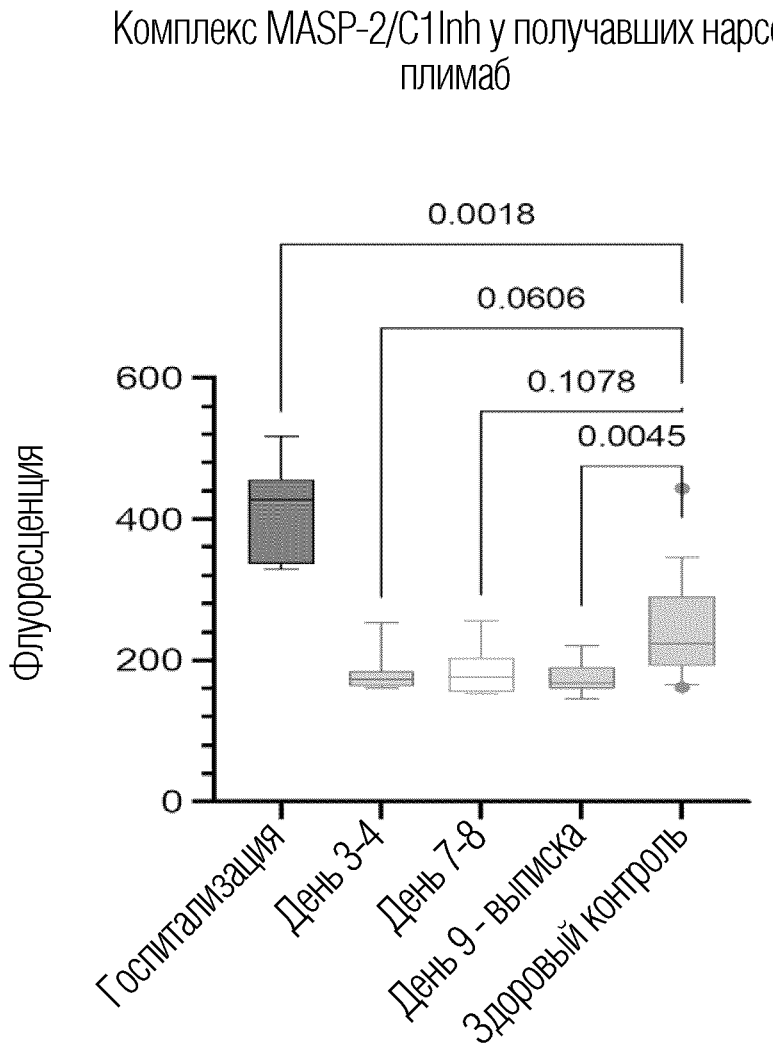
ФИГ. 66


CH50
300
200
100
0
Разведение сыворотки
***
***
***
Острая фаза, дни 0-4
Острая фаза, дни 5-10
Острая фаза, дни 11-15
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

ФИГ. 67


C5a в когорте не получавших лечения пациентов
в больнице Папворт
C5a нг/мл
2000
1500
1000
500
0
Острая фаза, дни 0-4
Острая фаза, дни 5-10
Острая фаза, дни 11-15
Выздоравливающие пациенты
Серопозитивный персонал
Серонегативный персонал

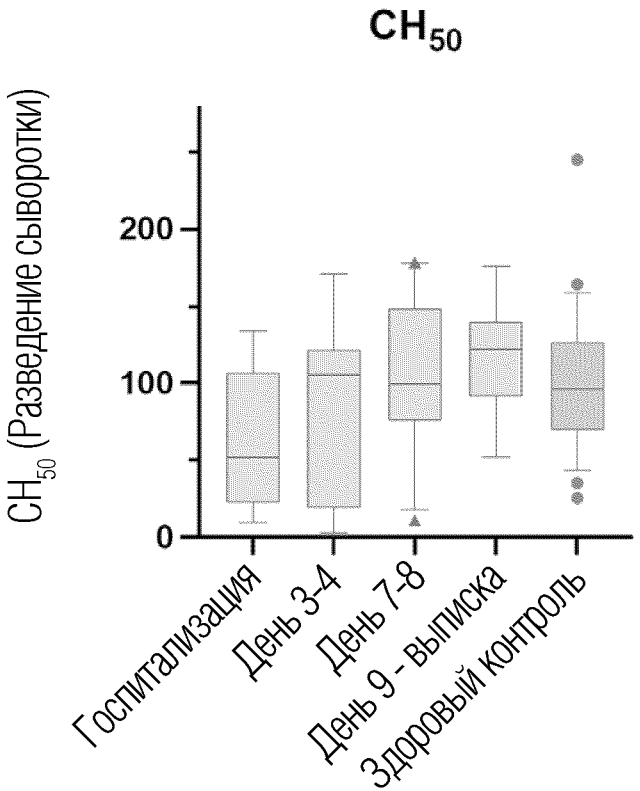
ФИГ. 68


Комплекс MASP-2/C1Inh у получавших нарсоплимаб
0.0018
0.0606
0.1078
0.0045
600
400
200
0
Флуоресценция
Госпитализация
День 3-4
День 7-8
День 9 - выписка
Здоровый контроль

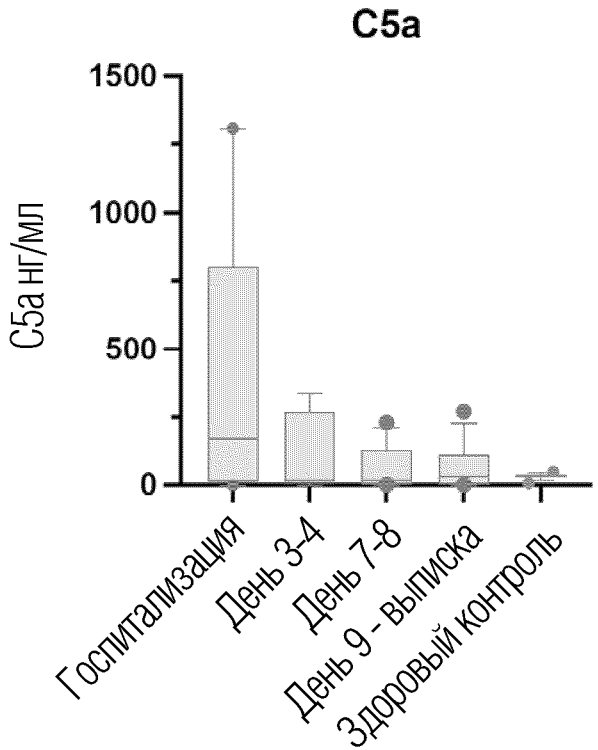
ФИГ. 69

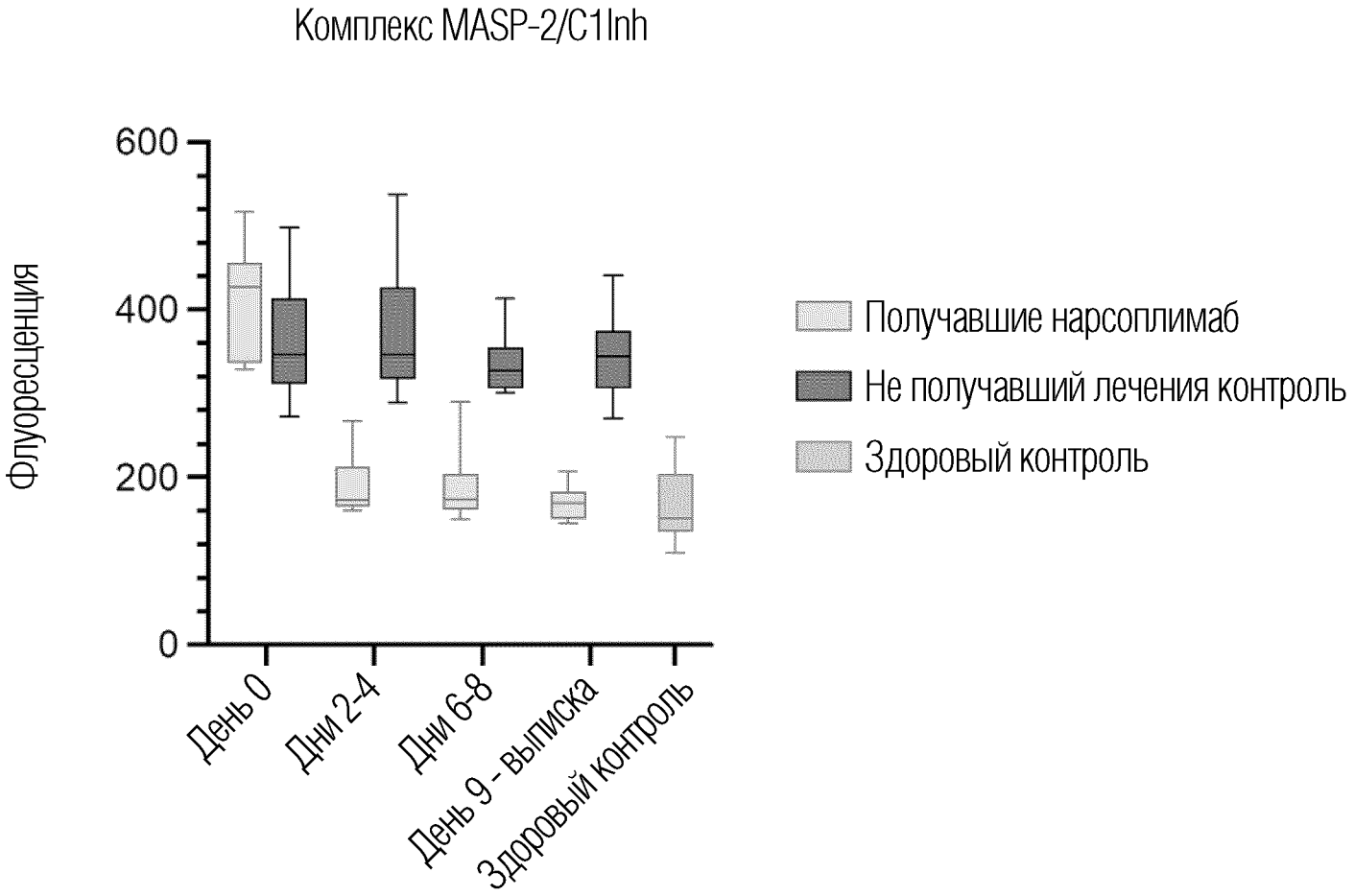
Получавшие нарсоплимаб

ФИГ. 70А



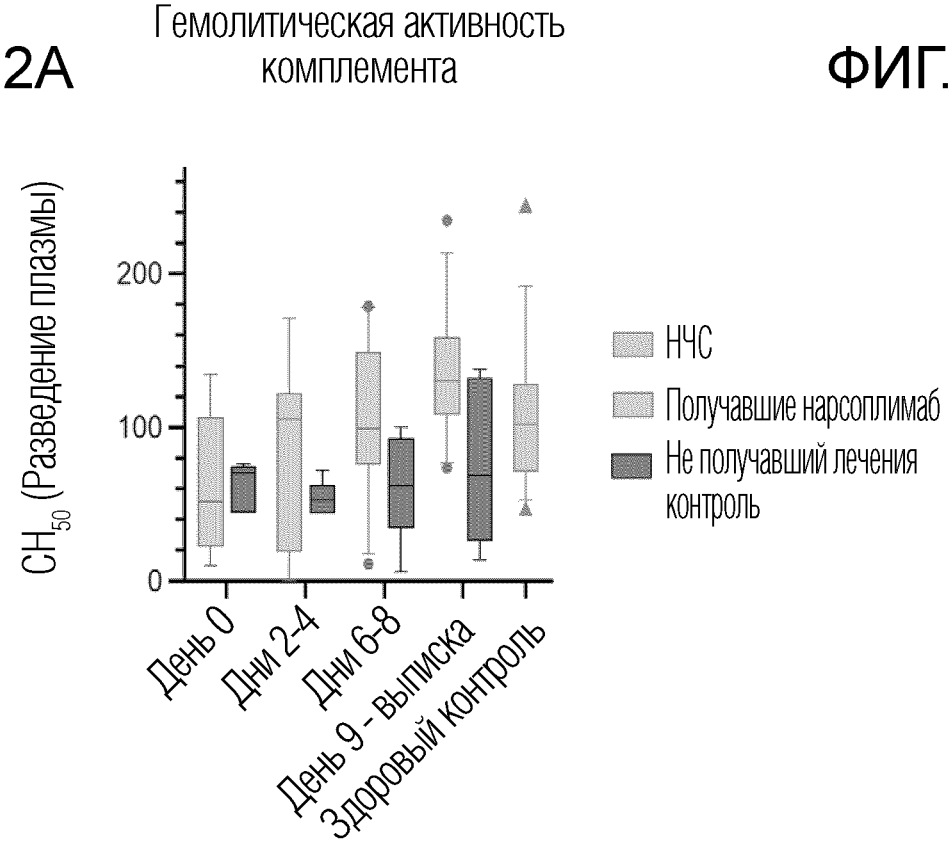
ФИГ. 70В



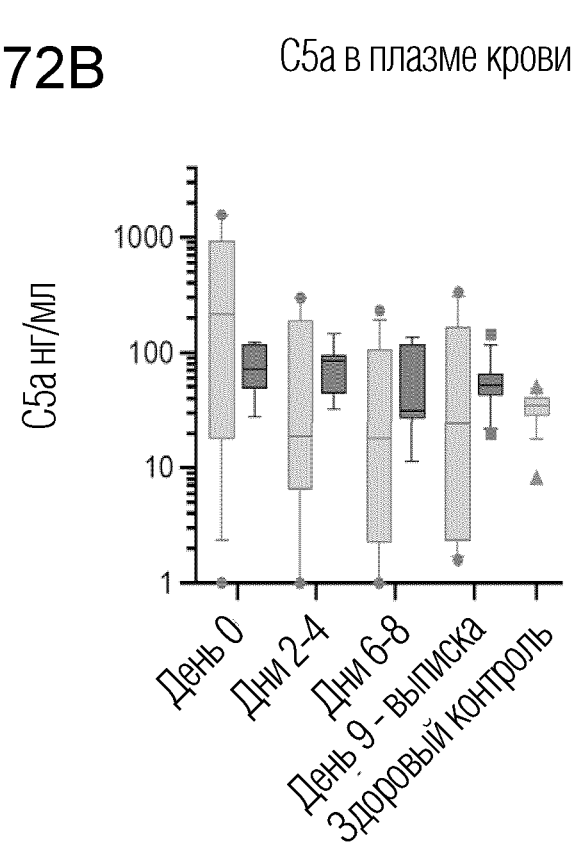

Комплекс MASP-2/C1Inh
Флуоресценция
600
400
200
0
День 0
Дни 2-4
Дни 6-8
День 9 - выписка
Здоровый контроль
Получавшие нарсоплимаб
Не получавший лечения контроль
Здоровый контроль

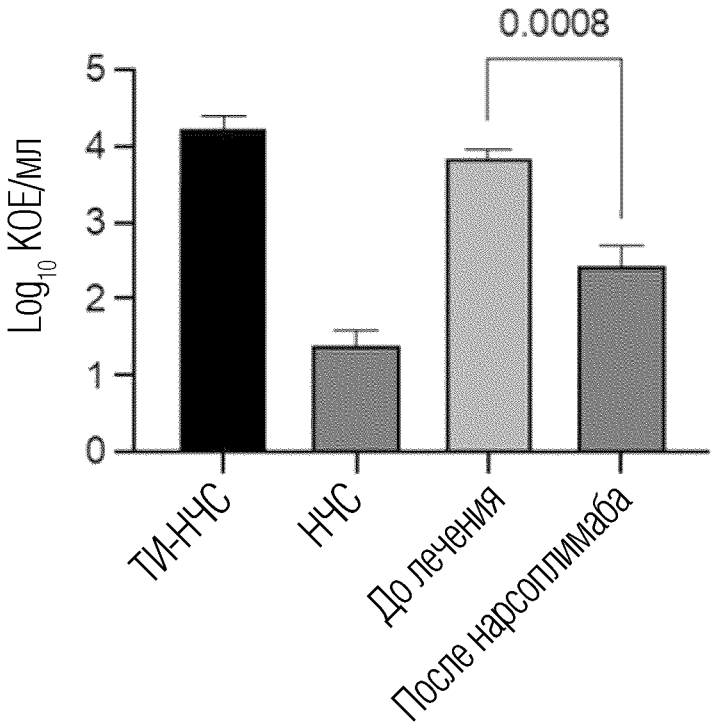
ФИГ. 71

ФИГ. 72A



ФИГ. 72B




0.0008
5
4
3
2
1
0
Log10 КОЕ/мл
ТИ-ННС
ННС
До лечения
После нарсоплимаба

ФИГ. 73