



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130965** (13) **C2**

(51) МПК (2026.01)

A61K 39/395 (2006.01) **A61P 39/00**
C07K 16/40 (2006.01) **A61P 7/02** (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) **A61P 37/06** (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	a 2020 01720	(72) Винахідник(и): Демопулос Грегори А. (US), Дадлер Томас (US), Швебле Ганс-Вільгельм (GB)
(22) Дата подання заявки:	14.08.2018	(73) Володілець (володільці): ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН, 201 Elliott Avenue West, Seattle, WA 98119, United States of America (US), ЮНІВЕРСИТІ ОФ ЛЕСТЕР, University Road, Leicester LE1 7RH, United Kingdom (GB)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	02.07.2026	(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/545,864, 62/574,690, 62/630,756, 62/637,281	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA a201806416, 12.11.2018 US 2017/0137537 A1, 18.05.2017 US 2013/0244924 A1, 19.09.2013 FERNANDEZ C. et al. Eculizumab Treatment in a Patient with Hematopoietic Stem Cell Transplantation-Associated Thrombotic Microangiopathy and Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease // Hematol Rep. 23.11.2015. Vol. 7. No. 6107. P. 88-89 DOI: 10.4081/hr.2015.6107 WO 2016/198133 A1, 15.12.2016 SUZUKI S. et al. Immune-mediated motor polyneuropathy after hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant. 14.05.2007. Vol. 40. P. 289-291 DOI: 10.1038/sj.bmt.1705716 ZHUANG H. et al. Pathogenesis of diffuse alveolar hemorrhage in murine lupus // Arthritis Rheumatol. June 2017. Vol. 69. No 6. P. 1280-1293 DOI: 10.1002/art.40077 MAJHAIL N. S. et al. Diffuse alveolar hemorrhage and infection-associated alveolar hemorrhage following hematopoietic stem cell transplantation: related and high- risk clinical syndromes // Biol Blood Marrow Transplant. October 2006. Vol. 12. P. 1038-1046 DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.06.002 US 2008/0193414 A1, 14.08.2008 SAHIN U. et al. An overview of hematopoietic stem cell transplantation related thrombotic complications // Grit Rev Oncol Hematol. 22.09.2016. Vol. 107. P. 149-155 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.09.004 Khan M. A. et al. Targeted complement inhibition and microvasculature in transplants: a therapeutic perspective // Clin Exp Immunol. 05.11.2015. Vol. 183. P. 175-186 doi: 10.1111/cei.12713 US 2016/0002349 A1, 07.01.2016 US 2015/0166675 A1, 18.06.2015 US 2013/0266560 A1, 10.10.2013 HEITZENEDER S. et al. Mannan-binding lectin deficiency attenuates acute GvHD in pediatric hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplantation. 11.05.2015. P. 1-3 [online] DOI: 10.1038/BMT.2015.81 [retrieved 13.06.2024]
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.08.2017, 19.10.2017, 14.02.2018, 01.03.2018	
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.07.2020, Бюл.№ 13	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	01.07.2026, Бюл.№ 26	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2018/046690, 14.08.2018	

UA 130965 C2

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РЕАКЦІЇ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИ ХАЗЯЇНА

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на реакцію трансплантат проти хазяїна (GVHD), що включає введення композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло, що істотно не інгібує класичний шлях активації комплементу. Також розкривається інгібування ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта-людини, який страждає від дифузної альвеолярної кровотечі і/або венооклюзійної хвороби, пов'язаних з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин.



Fig. 61

ЗАЯВА ВІДНОСНО СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Список послідовностей, який стосується даної заявки, наданий в текстовому форматі замість паперової копії і включений в даний опис за допомогою посилання. Текстовий файл, що містить список послідовностей, має назву MP_1_0278_PCT_SequenceListingasFiled_201808.txt; файл має розмір 116 KB; він був створений 7 серпня 2018 р., і був поданий через EFS-Web при подачі заявки.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Система комплементу забезпечує механізм ранньої дії для ініціації, посилення і організацій імунної відповіді на мікробну інфекцію і інші гострі ушкоджуючі чинники (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, в: Fundamental Immunology, Third Edition, під редакцією W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York) у людини і інших хребетних. При тому, що активація комплементу забезпечує цінний захист першої лінії від потенційних патогенів, активність комплементу, яка сприяє захисній імунній відповіді, також може представляти потенційну загрозу для хазяїна. (K.R. Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol. 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Наприклад, протеолітичні продукти C3 і C5 залучають і активують нейтрофіли. Будучи незамінними для захисту хазяїна, активовані нейтрофіли є невідбирковими у вивільненні руйнівних ферментів і можуть викликати пошкодження органів. Крім того, активація комплементу може викликати відкладення літичних компонентів комплементу на сусідніх клітинах-хазяїнах, як і на мікробних мішенях, що приводить до лізису клітини-хазяїни. Система комплементу також залучена до патогенезу численних гострих і хронічних захворювань, включаючи: інфаркт міокарда, інсульт, ARDS, реперфузійне пошкодження, септичний шок, підвищену проникність капілярів після термічних опіків, запалення після застосування апарату штучного кровообігу, відторгання трансплантата, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, міастенію і хворобу Альцгеймера. Майже при всіх цих станах комплемент не є причиною, а є одним з декількох факторів, залучених до патогенезу. Проте, активація комплементу може бути основним патологічним механізмом і являє собою ефективну ланку для клінічного контролю у багатьох з цих хворобливих станів. Зростаюче визнання важливості опосередкованого комплементом пошкодження тканин при різних хворобливих станах підкреслює необхідність в ефективних лікарських засобах, які інгібують комплемент. У цей час екулізумаб (солірис®), антитіло проти C5, є єдиним направленим на комплемент лікарським засобом, який був схвалений для лікування людей. Проте, C5 є однією з декількох ефекторних молекул, розташованих "нижче за плином" в системі комплементу, і блокада C5 не перешкоджає активації системи комплементу. Внаслідок цього, інгібітор етапів ініціації активації комплементу буде мати значні переваги порівняно з інгібітором діючих на більш пізніх етапах компонентів комплементу.

У цей час широко поширена думка, що система комплементу може бути активована трьома різними шляхами: класичним шляхом, лектиновим шляхом і альтернативним шляхом. Класичний шлях, як правило, запускається комплексом, що складається з антитіл хазяїна, пов'язаних з чужорідною частинкою (тобто, антигеном), і, таким чином, для нього необхідний попередній вплив антигену для індукції відповіді у вигляді вироблення специфічних антитіл. Оскільки активація класичного шляху залежить від попередньої адаптивної імунної відповіді хазяїна, класичний шлях є частиною набутої імунної системи. Навпаки, як лектиновий, так і альтернативний, шляхи не залежать від адаптивного імунітету і є частиною вродженої імунної системи.

Активація системи комплементу приводить до послідовної активації зимогенів серинових протеаз. Першим етапом активації класичного шляху є зв'язування специфічної молекули впізнавання, C1q, з молекулами IgG і IgM, зв'язаними з антигеном. Компонент C1q зв'язаний з проферментами серинових протеаз C1r і C1s в комплекс, який називається C1. Після зв'язування C1q з імунним комплексом відбувається аутопротеолітичне розщеплення сайту Arg-Ile в C1r, з подальшим опосередкованим C1r розщепленням і активацією C1s, який внаслідок цього набуває здатність розщеплювати C4 і C2. C4 розщеплюється на два фрагменти, позначені C4a і C4b, і, аналогічно, C2 розщеплюється на C2a і C2b. Фрагменти C4b здатні утворювати ковалентні зв'язки з сусідніми гідроксильними або аміногрупами і створювати C3-конвертазу (C4b2a) за рахунок нековалентної взаємодії з фрагментом C2a активованого C2. C3-конвертаза (C4b2a) активує C3 шляхом його протеолітичного розщеплення на підкомпоненти C3a і C3b, що приводить до утворення C5-конвертази (C4b2a3b), яка шляхом розщеплення C5 приводить до утворення мембраноатакуючого комплексу (C5b в поєднанні з C6, C7, C8 і C-9, що також називається "MAC"), який може руйнувати клітинні мембрани, приводячи до лізису клітин. Активовані форми C3 і C4 (C3b і C4b) утворюють ковалентні відкладення на поверхнях чужорідних мішеней, які впізнаються рецепторами комплементу на множині фагоцитів.

Незалежно, перший етап в активації системи комплементу через лектиновий шлях також являє собою зв'язування специфічних молекул впізнавання, з подальшою активацією зв'язаних проферментів серинових протеас. Однак замість зв'язуючого імунні комплекси C1q молекули впізнавання в лектиновому шляху включають групу вуглевод-зв'язувальних білків (манан-зв'язувальний лектин (MBL), Н-фіколін, М-фіколін, L-фіколін і лектин С-типу CL-11), що мають загальну назву "лектини". Дивись J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)). Дивись також J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu Rev Immunol* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al., *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda з співавторами уперше продемонстрували, що подібно до C1q, MBL може активувати систему комплементу після зв'язування з покритими дріжджовим мананом еритроцитами незалежним від C4 чином (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, (1987)). MBL, представник сімейства білків колектинів, являє собою кальцій-залежний лектин, який зв'язує вуглеводи з 3- і 4-гідроксильними групами, орієнтованими в екваторіальній площині піранозного кільця. Таким чином, головними лігандами для MBL є D-маноза і N-ацетил-D-глюкозамін, в той час як вуглеводи, які не відповідають цій стеричній вимозі, мають афінність для MBL, яка не піддається виявленню (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). Взаємодія між MBL і одновалентним цукром є надзвичайно слабкою, з константами дисоціації, як правило, в мілімолярному діапазоні з однозначними значеннями. MBL досягає міцного специфічного зв'язування з глікановими лігандами за рахунок авідності, тобто, за рахунок одночасної взаємодії з множиною моносахаридних залишків, розташованих в безпосередній близькості один від одного (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL впізнає вуглеводні патерни, які звичайно є на поверхні таких мікроорганізмів, як бактеріях, дріжджах, паразитах і деяких вірусах. Навпаки, MBL не впізнає D-галактозу і сіалову кислоту, передостанній і останній цукри, які звичайно присутні на "зрілих" складних глікокон'югатах, що знаходяться на глікопротеїнах плазми і клітинної поверхні у ссавців. Вважають, що ця специфічність зв'язування стимулює впізнавання "чужорідних" поверхонь і допомагає захищати від "самоактивації". Однак MBL зв'язує з високою афінністю кластери "попередників" гліканів з високим вмістом манози на N-зв'язаних глікопротеїнах і гліколіпідах, секвестрованих в ендоплазматичному ретикулумі і апараті Гольджі в клітинах ссавців (Maynard et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, (1982)). Внаслідок цього, пошкоджені клітини є потенційними мішенями для активації лектинового шляху за рахунок зв'язування MBL.

Фіколіни мають інший тип домену лектину, ніж MBL, який називається фібриноген-подібним доменом. Фіколіни зв'язують цукрові залишки незалежним від Ca^{++} чином. У людини ідентифіковані фіколіни трьох видів (L-фіколін, М-фіколін і Н-фіколін). Два сироваткові фіколіни, L-фіколін і Н-фіколін, мають спільну специфічність відносно N-ацетил-D-глюкозаміну; однак Н-фіколін також зв'язує N-ацетил-D-галактозамін. Різниця в специфічності L-фіколіну, Н-фіколіну, CL-11 і MBL відносно цукрів означає, що різні лектини можуть бути комплементарними і мати мішенню різні, хоч і перекривні, глікокон'югати. На користь даної концепції свідчить нещодавне повідомлення про те, що з відомих лектинів в лектиновому шляху лише L-фіколін зв'язує специфічно ліпотьєхоеву кислоту, глікокон'югат клітинної стінки, виявлений на всіх грампозитивних бактеріях (Lynch et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, (2004)). Колектини (тобто, MBL) і фіколіни не мають значної схожості амінокислотних послідовностей. Однак дві групи білків мають схожу організацію доменів і, подібно до C1q, збираються в олігомерні структури, які максимально збільшують можливість зв'язування у множині сайтів.

Сироваткові концентрації MBL є високо варіабельними в популяціях здорових суб'єктів, і це генетично контролюється за рахунок поліморфізму/мутації як в промоторі, так і в кодуючих областях гена MBL. Експресія MBL, як білка гострої фази, додатково стимулюється при запаленні. L-фіколін присутній в сироватці в концентраціях, аналогічних концентраціям MBL. Таким чином, L-фіколінова гілка лектинового шляху потенційно порівнянна з гілкою MBL по силі. MBL і фіколіни також можуть діяти як опсоніни, що дозволяє фагоцитам націлюватися на поверхні, які містять MBL і фіколін (дивись Jack et al., *J. Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol*, 174(1):418-25(2005). Для такої опсонізації необхідна взаємодія цих білків з рецепторами фагоцитів (Kuhlman et al., *J. Exp. Med.* 169:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, (1996)), які не ідентифіковані.

Людський MBL вступає в специфічну і високоафінну взаємодію через його колаген-подібну домен з унікальними C1r/C1s-подібний сериновими протеазами, які називаються "MBL-асоційовані серинові протеази (MASP)". До цього часу описані три MASP. По-перше, один

фермент "MASP" був ідентифікований і охарактеризований як фермент, відповідальний за ініціацію каскаду комплементу (тобто, розщеплення C2 і C4) (Matsushita et al., J Exp Med 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., J. Immunol. 150:571-578, (1993)). Згодом було визначено, що активність MASP фактично являла собою активність суміші двох протеаз: MASP-1 і MASP-2 (Thiel et al., Nature 386:506-510, (1997)). Однак було продемонстровано, що одного комплексу MBL-MASP-2 достатньо для активації комплементу (Vorup-Jensen et al., J. Immunol. 165:2093-2100, (2000)). Більше того, тільки MASP-2 розщеплював C2 і C4 з високою швидкістю (Ambrus et al., J. Immunol. 170:1374-1382, (2003)). Таким чином, MASP-2 являє собою протеазу, відповідальну за активацію C4 і C2, з утворенням C3-конвертази, C4b2a. Це є істотною відмінністю від комплексу C1 класичного шляху, де координована дія двох специфічних серинових протеаз (C1r і C1s) приводить до активації системи комплементу. Крім того, була виділена третя нова протеаза, MASP-3, (Dahl, M.R., et al., Immunity 15:127-35, 2001). MASP-1 і MASP-3 являють собою продукти альтернативного сплайсингу одного і того ж гена.

MASP мають організацію доменів, ідентичну такій в C1r і C1s, ферментативних компонентах комплексу C1 (Sim et al., Biochem. Soc. Trans. 28:545, (2000)). Ці домени включають N-кінцевий домен C1r/C1s/VEGF морського їжака/кісткового морфогенетичного білка (CUB), подібний до епідермального фактора росту домен, другий домен CUB, тандем доменів контрольного білка комплементу і домен серинової протеази. Як і в протеазах C1, активація MASP-2 відбувається внаслідок розщеплення зв'язку Arg-Ile поблизу домену серинової протеази, що приводить до розділення ферменту на зв'язані дисульфідним зв'язком ланцюга A і B, останній з яких складається з домену серинової протеази.

MBL також може зв'язуватися з альтернативно сплайсованою формою MASP-2, відомою як MBL-асоційований білок розміром 19 кДа (MAp19), або малий MBL-асоційований білок (sMAP), який позбавлений каталітичної активності MASP2. (Stover, J. Immunol. 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-863, (1999)). MAp19 містить перші два домени MASP-2, за якими йде додаткова послідовність з чотирьох унікальних амінокислот. Функція MAp19 незрозуміла (Degn et al., J Immunol. Methods, 2011). Гени MASP-1 і MASP-2 розташовані на хромосомах 3 і 1 людини, відповідно (Schwaebler et al., Immunobiology 205:455-466, (2002)).

Деякі дані дозволяють передбачити, що існують різні комплекси MBL-MASP, і велика фракція MASP в сироватці не знаходиться в комплексі з MBL (Thiel, et al., J. Immunol. 165:878-887, (2000)). Як H-, так і L-фіколін, зв'язують всі MASP і активують лектиновий шлях комплементу, аналогічно MBL (Dahl et al., Immunity 15:127-35, (2001); Matsushita et al., J. Immunol. 168:3502-3506, (2002)). Як в лектиновому, так і в класичному, шляхах утворюється C3-конвертаза (C4b2a), і на даному етапі ці два шляхи сходяться.

Прийнято вважати, що лектиновий шлях відіграє основну роль в захисті хазяїна від інфекції у хазяїна, який раніше не піддався впливу. Переконливі докази участі MBL в захисті хазяїна отримані на основі аналізу пацієнтів, що мають знижені сироваткові рівні функціонального MBL (Kilpatrick, Biochim. Biophys. Acta 1572:401-413, (2002)). У таких пацієнтів звичайно спостерігається тенденція до рецидивів бактеріальних і грибкових інфекцій. Ці симптоми звичайно виявляються в ранньому віці, під час очевидного періоду уразливості, коли титр антитіл, отриманих від матері, знижується, але ще не формується повний репертуар власних антитіл. Цей синдром часто є наслідком мутацій в декількох сайтах колагенової частини MBL, які перешкоджають правильному формуванню олігомерів MBL. Однак, оскільки MBL може функціонувати як опсонін, незалежний від комплементу, то невідомо, до якого ступеню підвищена сприйнятливості до інфекцій залежить від порушеної активації комплементу.

На відміну від класичного і лектинового шляхів, не знайдено жодного ініціатора альтернативного шляху для виконання функцій розпізнавання, які C1q і лектини виконують в двох інших шляхах. У цей час поширена думка, що альтернативний шлях мимовільно піддається низькому рівню циклічної активації, яка може бути легко посилена на чужорідних або інших аномальних поверхнях (бактеріях, дріжджах, інфікованих вірусом клітинах або пошкодженій тканині), в яких відсутні належні молекулярні елементи, що втримують під контролем спонтанну активацію комплементу. Існують чотири білки плазми, безпосередньо залучені до активації альтернативного шляху: C3, фактор B і D, а також пропердин.

Хоча існує велика кількість доказів, які вказують на участь як класичних, так і альтернативного, шляхів комплементу в патогенезі неінфекційних захворювань людини, роль лектинового шляху тільки починають вивчати. Нещодавні дослідження надають докази того, що лектиновий шлях активації може бути відповідальний за активацію комплементу і пов'язане запалення при ішемії/реперфузійному ушкодженні. Collard з співавторами (2000) повідомляли про те, що культивовані ендотеліальні клітини, піддані окиснювальному стресу, зв'язують MBL, і на них відбувається відкладення C3 під впливом людської сироватки (Collard et al., Am. J.

Pathol. 156:1549-1556, (2000)). Крім того, обробка людською сироваткою з блокуючими анти-MBL моноклональними антитілами інгібувала зв'язування MBL і активацію комплементу. Аналогічні результати були отримані в щурячій моделі міокардіальної ішемії-реперфузії, в якій у щурів, яким вводили блокуюче антитіло, направлене проти щурячого MBL, спостерігали значно менше пошкодження міокарда при оклюзії коронарної артерії, ніж у щурів, що отримували контрольне антитіло (Jordan et al., Circulation 104:1413-1418, (2001)). Молекулярний механізм зв'язування MBL з ендотелієм судин після окиснювального стресу незрозумілий; результати нещодавнього дослідження дозволяють передбачити, що активація лектинового шляху після окиснювального стресу може бути опосередкована зв'язуванням MBL з цитоцератинами ендотелію судин, а не з глікокон'югатами (Collard et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, (2001)). Результати інших досліджень вказують на участь класичного і альтернативного шляхів в патогенезі ішемії/реперфузійного ушкодження, і роль лектинового шляху в даному захворюванні залишається неоднозначною (Riedermann, N.C., et al., Am. J. Pathol. 162:363-367, 2003).

У нещодавньому дослідженні було продемонстровано, що MASP-1 (і можливо також MASP-3) необхідний для перетворення ферменту альтернативного шляху активації фактора D з його форми зимогену в ферментативно активну форму (дивись Takahashi M. et al., J Exp Med 207(1):29-37 (2010)). Фізіологічна важливість цього процесу підкреслюється відсутністю функціональної активності альтернативного шляху в плазмі у мишей з дефіцитом MASP-1/3. Протеолітичне утворення C3b з нативного C3 необхідне для функціонування альтернативного шляху. Оскільки C3-конвертаза альтернативного шляху (C3bBb) містить C3b як основну субодиницю, питання про походження першого C3b в процесі альтернативного шляху є загадкою, яка стимулювала численні дослідження.

C3 належить до сімейства білків (поряд з C4 і α -2 макроглобуліном), що мають рідкісну посттрансляційну модифікацію, відому як тіоефірний зв'язок. Тіоефірна група складається з глутаміну, кінцева карбонільна група якого утворює ковалентний тіоефірний зв'язок з сульфгідрильною групою цистеїну, що знаходиться від нього через три амінокислоти. Цей зв'язок є нестабільним, і електрофільний глутаміл-тіоефір може реагувати з нуклеофільними групами, такими як гідроксильні або аміногрупи, і, таким чином, утворювати ковалентний зв'язок з іншими молекулами. Тіоефірний зв'язок є досить стабільним, коли він секвестрований в гідрофобній кишені інтактного C3. Однак протеолітичне розщеплення C3 до C3a і C3b приводить до експонування високореактивного тіоефірного зв'язку на C3b і після нуклеофільної атаки сусідніх фрагментів, що містять гідроксильні або аміногрупи, C3b стає ковалентно зв'язаним з мішенню. Крім його добре відомої ролі в ковалентному приєднанні C3b до мішеней комплементу, тіоефір C3 також, як вважають, відіграє ключову роль в запуску альтернативного шляху. Відповідно до широко поширеної теорії "холостого ходу" альтернативний шлях запускається утворенням конвертази рідкої фази, iC3Bb, яка утворюється з C3 з гідролізованим тіоефіром (iC3; C3(H₂O)) і фактора B (Lachmann, P.J., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7:143-162, (1984)). C3b-подібний до C3(H₂O) утворюється з нативного C3 шляхом повільного спонтанного гідролізу внутрішнього тіоефіра в білку (Pangburn, M.K., et al., J. Exp. Med. 154:856-867, 1981). За рахунок активності конвертази C3(H₂O)Bb молекули C3b відкладаються на поверхні мішені, тим самим запускаючи альтернативний шлях.

Про ініціаторів активації альтернативного шляху відомо дуже мало. Вважається, що активатори включають клітинну стінку дріжджів (зимозан), багато чистих полісахаридів, кролячі еритроцити, деякі імуноглобуліни, віруси, грибки, бактерії, клітини пухлин тварин, паразити і пошкоджені клітини. Єдиною спільною межею у цих активаторів є присутність вуглеводу, однак складність і різноманітність вуглеводних структур затрудняють визначення загальних впізнаваних молекулярних детермінант. Широко визнано, що активація альтернативного шляху контролюється за допомогою точного балансу між інгібуючими регуляторними компонентами цього шляху, такими як фактор H, фактор I, DAF і CR1, і пропердином, який є єдиним позитивним регулятором альтернативного шляху (дивись Schwaebble W.J. and Reid K.B., Immunol Today 20(1):17-21 (1999)).

Крім явно нерегульованого механізму активації, описаного вище, альтернативний шлях може також забезпечувати могутній цикл посилення для C3-конвертази лектинового/класичний шляху (C4b2a), оскільки будь-який C3b, що утворився, може брати участь з фактором B в формуванні додаткової C3-конвертази (C3bBb) альтернативного шляху. C3-конвертаза альтернативного шляху стабілізується за рахунок зв'язування пропердину. Пропердин продовжує період напіввиведення C3-конвертази альтернативного шляху в шість-десять разів. Додавання C3b до C3-конвертази альтернативного шляху приводить до утворення C5-конвертази альтернативного шляху.

Прийнято вважати, що всі три шляхи (тобто, класичний, лектиновий і альтернативний)

сходяться на C5, який розщеплюється, з утворенням продуктів з множиною прозапальних ефектів. Конвергований шлях був названий термінальним шляхом комплементу. C5a є найбільш потужним анафілатоксином, що викликає зміни тонуусу гладких м'язів і судин, а також проникність судин. Він також є сильним хемотаксином і активатором як нейтрофілів, так і моноцитів. Опосередковувана C5a клітинна активація може значно посилювати запальні відповіді, індукуючи вивільнення множини додаткових медіаторів запалення, включаючи цитокіни, гідролітичні ферменти, метаболіти арахідонової кислоти і активні форми кисню. Розщеплення C5 приводить до утворення C5b-9, також відомого як мембраноатакуючий комплекс (MAC). У цей час є переконливі докази того, що сублітичне відкладення MAC може відігравати важливу роль в запаленні, в доповнення до його ролі літичного пороутворювального комплексу.

Крім її важливої ролі в імунному захисті, система комплементу сприяє пошкодженню тканин при багатьох клінічних станах. Таким чином, існує гостра потреба в розробці терапевтично ефективних інгібіторів комплементу для запобігання цим несприятливим ефектам.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний короткий виклад призначений для представлення в спрощеній формі вибраних концепцій, які додатково описані нижче в розділі "Детальний опис винаходу". Даний короткий виклад не призначений для визначення ключових ознак заявленого об'єкта винаходу, а також не призначений для використання у визначенні об'єму заявленого об'єкта винаходу. У одному аспекті даний винахід стосується способу інгібування пошкодження мікрovasкулярних ендотеліальних клітин і/або утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на тромботичну мікроангіопатію (ТМА), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА, вибраної з групи, яка складається з гемолітичного уремичного синдрому (HUS), тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП) і атипового гемолітичного уремичного синдрому (аHUS). У деяких варіантах здійснення перед введенням композиції визначають, що суб'єкт виявляє один або більше симптомів, вибраних з групи, яка складається з (i) анемії, (ii) тромбоцитопенії, (iii) ниркової недостатності і (iv) підвищеного рівня креатиніну, і композицію вводять в ефективній кількості і протягом достатнього періоду часу для ослаблення вказаного одного або більше симптомів. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікрovasкулярних ендотеліальних клітин.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, атипового гемолітичного уремичного синдрому (аHUS), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення перед введенням композиції визначають, що суб'єкт виявляє один або більше симптомів, вибраних з групи, яка складається з (i) анемії, (ii) тромбоцитопенії, (iii) ниркової недостатності і (iv) підвищеного рівня креатиніну, і композицію вводять в ефективній кількості і протягом достатнього періоду часу для ослаблення вказаного одного або більше симптомів. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, що не залежить від фактора H аHUS. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на аHUS, пов'язаний з фактором I, фактором B або мембранним кофактором CD46. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікрovasкулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті винахід стосується способу зменшення імовірності того, що суб'єкт, який має ризик розвитку атипового гемолітичного уремичного синдрому (аHUS), буде страждати на клінічні симптоми, пов'язані з аHUS. Спосіб за даним аспектом винаходу включає (a) визначення наявності у суб'єкта генетичного маркера, який, як відомо, зв'язаний з аHUS; (b) періодичний моніторинг суб'єкта для визначення наявності або відсутності щонайменше одного симптому, вибраного з групи, яка складається з анемії, тромбоцитопенії, ниркової недостатності і підвищеного рівня креатиніну; і (c) введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу, при визначенні наявності щонайменше одного з анемії, тромбоцитопенії, ниркової недостатності або

підвищеного рівня креатиніну, при цьому композицію вводять в ефективній кількості і протягом достатнього періоду часу для ослаблення вказаного одного або більше симптомів. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення способу етап (а) включає проведення генетичного скринінгу зразка, отриманого від суб'єкта, і визначення наявності щонайменше одного генетичного маркера, пов'язаного з aHUS, в гені, вибраному з групи, яка складається з генів фактора H (CFH), фактора I (CFI), фактора B (CFB) комплексу, мембранного кофактора CD46, C3, пов'язаного з фактором H комплексу білка (CFHR1), антикоагулянтного білка тромбомодуліну (THBD), зв'язаного з фактором H комплексу білка 3 (CFHR3) і зв'язаного з фактором H комплексу білка 4 (CFHR4). У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає моніторинг суб'єкта відносно виникнення події, яка, як відомо, пов'язана з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, і введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, до, в процесі, або після виникнення ініціюючої події. У одному варіанті здійснення події, пов'язану з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, вибирають з групи, яка складається з впливу лікарського засобу, інфекції, зловживання новоутворення, травми, трансплантації органу або тканини і вагітності. У одному варіанті здійснення інфекція являє собою бактеріальну інфекцію. У одному варіанті здійснення композицію вводять підшкірно. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікроvasкулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплексу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, атипового гемолітичного уремичного синдрому (aHUS) внаслідок інфекції, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплексу. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, не ентерального aHUS, пов'язаного з інфекцією, що викликається *S. pneumoniae*. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікроvasкулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на атиповий гемолітичний уремичний синдром (aHUS), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплексу, при цьому введення інгібуючого MASP-2 засобу виконують способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає лікування пацієнта з використанням плазмаферезу. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуючий MASP-2 засіб, вводять без плазмаферезу. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуючий MASP-2 засіб, вводять через катетер протягом першого періоду часу, з подальшим введенням композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, протягом другого періоду часу, при цьому протягом другого періоду часу композицію вводять підшкірно. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає періодичне визначення рівня щонайменше одного фактора комплексу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплексу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікроvasкулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру (ТТП), або що має симптоми, які відповідають діагнозу ТТП, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплексу, при цьому введення інгібуючого MASP-2 засобу виконують способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер. У одному варіанті здійснення суб'єкт має щонайменше один або більше симптомів, вибраних з групи, яка складається з ураження центральної нервової системи, тромбоцитопенії, тяжкого ураження серця, тяжкого ураження легень, інфаркту кишечника і гангрени. У одному варіанті здійснення суб'єкт має позитивні результати тесту на наявність

інгібітора ADAMTS-13, і спосіб додатково включає введення суб'єкту імунодепресанта. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуючий MASP-2 засіб, вводять протягом першого періоду часу без плазмаферезу. У одному варіанті здійснення суб'єкт має позитивні результати тесту на наявність інгібітора ADAMTS-13, і спосіб додатково включає введення ADAMTS-13. У
 5 одному варіанті здійснення спосіб додатково включає лікування пацієнта з використанням плазмаферезу. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуючий MASP-2 засіб, вводять в поєднанні з плазмаферезом. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуючий MASP-2 засіб, вводять через катетер протягом першого періоду часу, з подальшим введенням композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, протягом другого періоду часу, при
 10 цьому протягом другого періоду часу композицію вводять підшкірно. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає періодичне визначення рівня щонайменше одного фактора комплементу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією. У одному варіанті здійснення інгібуючий
 15 MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікроваскулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на рефрактерну тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру (ТТП), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення композицію вводять підшкірно. У
 25 одному варіанті здійснення спосіб додатково включає періодичне визначення рівня щонайменше одного фактора комплементу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, таке як анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно
 30 зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує пошкодження мікроваскулярних ендотеліальних клітин. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб інгібує утворення тромбів.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (ТМА), при цьому ТМА являє собою щонайменше одне з (i) ТМА в результаті раку; (ii) ТМА внаслідок хіміотерапії або (iii) ТМА внаслідок трансплантації, який включає введення суб'єкту
 35 композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА в результаті раку, і інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту системно в кількості, ефективній для зменшення ризику розвитку ТМА або зменшення ступеню тяжкості
 40 ТМА. У деяких варіантах здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА внаслідок хіміотерапії, і інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту системно до, в процесі, або після хіміотерапії в кількості, ефективній для зменшення ризику розвитку ТМА або зменшення ступеню тяжкості ТМА. У деяких варіантах здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА внаслідок трансплантації, і інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту системно
 45 до, в процесі, або після процедури трансплантації в кількості, ефективній для зменшення ризику розвитку ТМА або зменшення ступеню тяжкості ТМА. У деяких варіантах здійснення процедура трансплантації являє собою алогенну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин. У деяких варіантах здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування
 50 інгібітором термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу, наприклад, гуманізованого анти-C5 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, такого як екулізумаб.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, синдрому Апшо-Шульмана (USS), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в
 55 кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, що має ризик розвитку USS, що включає введення протягом певного періоду часу певної кількості інгібуючого MASP-2 засобу,
 60

ефективного для ослаблення або запобігання одному або більше клінічним симптомам, пов'язаним з ТТП. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає періодичний моніторинг суб'єкта і введення інгібуючого MASP-2 засобу при наявності події, яка, як відомо, пов'язана з ініціюванням клінічних симптомів ТТП. У деяких варіантах здійснення спосіб

5 додатково включає періодичний моніторинг суб'єкта і введення інгібуючого MASP-2 засобу при визначенні наявності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну. У деяких варіантах здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення суб'єкту інгібітора

10 термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу, наприклад, гуманізованого анти-C5 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, такого як екулізумаб.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, якому інгібує розщеплення

20 білка C5 комплементу, наприклад, гуманізованого анти-C5 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, такого як екулізумаб.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на катастрофічний антифосфоліпідний синдром (CAPS), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, якому інгібує розщеплення білка C5 комплементу, наприклад, гуманізованого анти-C5 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, такого як екулізумаб.

25

30

У деяких варіантах здійснення будь-якого з розкритих способів за винаходом інгібуючий MASP-2 засіб являє собою інгібуюче MASP-2 антитіло, або його фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має знижену ефекторну функцію. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення анти-MASP-2 антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою однокланцюжкову молекулу. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вибирають з групи, яка складається з молекули IgG1, IgG2 і молекул IgG4. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою молекулу IgG4 з мутацією S228P. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D, що становить 10 нМ або менше. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 10

40

45

50

нМ або менше. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з розкритих способів за винаходом інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить: (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого

55

60

ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний

фрагмент, специфічно впізнає щонайменше частину епітопа, впізнаваного еталонним антитілом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Інший аспект винаходу стосується способів інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на атиповий гемолітичний уремичний синдром (аHUS), що включає введення суб'єкту інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на аHUS, на щонайменше 40 % порівняно з контрольною сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на аHUS, на рівні, щонайменше на 20 % більшому (наприклад, щонайменше на 30 % більшому, щонайменше на 40 % більшому або щонайменше на 50 % більшому), ніж його інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці від того ж суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт має аHUS в гострій фазі. У деяких варіантах здійснення суб'єкт має аHUS в фазі ремісії. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує частину SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вибирають з групи, яка складається з молекули IgG1, IgG2 і молекул IgG4. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою молекулу IgG4 з мутацією S228P. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D, що становить 10 нМ або менше. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в in vitro аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 10 нМ або менше. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить: (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, специфічно впізнає щонайменше частину епітопа, впізнаваного еталонним антитілом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на стійкий до плазмотерапії аHUS, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу, наприклад, при цьому інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його

антигензв'язувальний фрагмент. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає лікування пацієнта з використанням плазмаферезу. У одному варіанті здійснення композицію, що містить інгібуюче MASP-2 антитіло, вводять без плазмаферезу.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на TMA, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою анти-MASP-2 моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до лікування з використанням переливання тромбоцитарної маси і/або стійка до лікування з використанням плазмаферезу.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більше клінічних параметрів, пов'язаного з TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, наприклад, збільшення кількості тромбоцитів (наприклад, збільшення щонайменше в два, щонайменше в три, щонайменше в чотири рази кількості тромбоцитів до початку лікування), підвищення рівня гаптоглобіну і/або зниження рівня лактатдегідрогенази.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на стійку TMA, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT-TMA), який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, що має стійку TMA, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 70. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять пацієнту без плазмаферезу. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування з використанням гуманізованого анти-C5 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, наприклад, при цьому інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту системно. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більше з наступних клінічних параметрів, пов'язаних з TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, наприклад, для: (i) збільшення кількості тромбоцитів (наприклад, збільшення щонайменше в два, щонайменше в три, щонайменше в чотири рази кількості тромбоцитів до початку лікування); (ii) підвищення рівня гаптоглобіну; (iii) зниження рівня лактатдегідрогенази (LDH) і/або (iv) зниження рівня креатиніну.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, реакції трансплантат проти хазяїна (GVHD), який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, або буде отримувати трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин. У одному

варіанті здійснення способу додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, реакції трансплантат проти хазяїна, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту системно. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на гостру GVHD. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на резистентну до стероїдів GVHD. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування, запобігання або ослаблення одного або більше неврологічних симптомів, пов'язаних з реакцією трансплантат проти хазяїна або TMA, що включає введення суб'єкту, який потребує цього, композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення один або більш неврологічних симптомів, пов'язаних з реакцією трансплантат проти хазяїна або TMA, вибирають з групи, яка складається з астенії, парестезії, тетраплегії, сенсорно-рухових порушень, вегето-судинної поліневропатії і/або нейрогенного сечового міхура. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримав трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин, і суб'єкт страждає на один або більше неврологічних симптомів, вибраних з групи, яка складається з парестезії, тетраплегії і нейрогенного сечового міхура. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримав трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин і страждає на реакцію трансплантат проти хазяїна. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримав трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин і страждає на HSCT-TMA. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту системно. У одному варіанті здійснення способу додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, який страждає на один або більше неврологічних симптомів, пов'язаних з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, дифузної альвеолярної кровотечі (DAH), пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, або буде отримувати трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин. У одному варіанті здійснення способу додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, дифузної альвеолярної кровотечі (DAH), перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його

фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло істотно відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло вводять суб'єкту системно. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У іншому аспекті даний винахід стосується композиції для інгібування несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу, що містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібує MASP-2 антитіло, і фармацевтично прийнятний носій. Також запропоновані способи виробництва лікарського препарату для використання в інгібуванні несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у живих суб'єктів, які потребують цього, що містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу в фармацевтичному носії. Також запропоновані способи виробництва лікарських препаратів для використання в інгібуванні MASP-2-залежної активації комплементу з метою лікування кожного з станів, захворювань і порушень, описаних нижче в цьому документі.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, венооклюзійної хвороби (VOD), пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібує MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення суб'єкт отримувач раніше, або отримує в цей час, або буде отримувати трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, венооклюзійної хвороби (VOD), перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібує MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло, або його фрагмент, яке специфічно зв'язує людський MASP-2. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло, або його фрагмент, вибирають з групи, яка складається з рекомбінантного антитіла, антитіла, що має знижену ефекторну функцію, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло істотно відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC₅₀, що становить 30 нМ або менше. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло вводять суб'єкту системно. У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У іншому аспекті даний винахід стосується композиції для інгібування несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу, що містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібує MASP-2 антитіло, і фармацевтично прийнятний носій. Також запропоновані способи виробництва лікарського препарату для використання в інгібуванні несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у живих суб'єктів, які потребують цього, що містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу в фармацевтичному носії. Також запропоновані способи виробництва лікарських препаратів для використання в інгібуванні MASP-2-залежної активації комплементу з метою лікування кожного з станів, захворювань і порушень, описаних нижче в цьому документі.

Способи, композиції і лікарські препарати за винаходом можуть бути використані для інгібування несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу in vivo у суб'єктів-савців, включаючи людей, які страждають на, або мають ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (ТМА), і/або суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, GVHD, і/або суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, дифузної альвеолярної кровотечі після трансплантації стовбурових клітин, і/або суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, венооклюзійної хвороби (VOD), як описано далі в цьому документі.

ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Вищевикладені аспекти і багато які супутні переваги даного винаходу стануть більш зрозумілими при вивченні детального опису, який йде далі, в поєднанні з прикладеними кресленнями, в яких:

- 5 ФІГУРА 1 являє собою діаграму, яка ілюструє геномну структуру людського MASP-2;
- ФІГУРА 2A являє собою схематичну діаграму, яка ілюструє доменну структуру людського білка MASP-2;
- ФІГУРА 2B являє собою схематичну діаграму, яка ілюструє доменну структуру людського білка MAP19;
- 10 ФІГУРА 3 являє собою діаграму, яка ілюструє стратегію нокауту мишачого MASP-2;
- ФІГУРА 4 являє собою діаграму, яка ілюструє конструкт мінігена людського MASP-2;
- ФІГУРА 5A представляє результати, які показують, що дефіцит MASP-2 приводить до втрати опосередкованої лектиновим шляхом активації C4, що визначають по відсутності відкладення C4b на манані, як описано в прикладі 2;
- 15 ФІГУРА 5B представляє результати, які показують, що дефіцит MASP-2 приводить до втрати опосередкованої лектиновим шляхом активації C4, що визначають по відсутності відкладення C4b на зимозані, як описано в прикладі 2;
- ФІГУРА 5C представляє результати, які показують відносні рівні активації C4 в зразках сироватки, отриманих від мишей ліній MASP-2^{+/-}; MASP-2^{-/-} і дикого типу, що визначають по відкладенню C4b на манані і на зимозані, як описано в прикладі 2;
- 20 ФІГУРА 6 представляє результати, які показують, що додавання мишачого рекомбінантного MASP-2 до MASP-2^{-/-} зразків сироватки приводить до відновлення опосередкованої лектиновим шляхом активації C4 залежним від концентрації білка чином, що визначають по відкладенню C4b на манані, як описано в прикладі 2;
- ФІГУРА 7 представляє результати, які показують, що класичний шлях є функціональним у мишей лінії MASP-2^{-/-}, як описано в прикладі 8;
- 25 ФІГУРА 8A представляє результати, які показують, що анти-MASP-2 Fab2 антитіло № 11 інгібує утворення C3-конвертази, як описано в прикладі 10;
- ФІГУРА 8B представляє результати, які показують, що анти-MASP-2 Fab2 антитіло № 11 зв'язує природний щурячий MASP-2, як описано в прикладі 10;
- 30 ФІГУРА 8C представляє результати, які показують, що анти-MASP-2 Fab2 антитіло № 41 інгібує розщеплення C4, як описано в прикладі 10;
- ФІГУРА 9 представляє результати, які показують, що всі протестовані анти-MASP-2 Fab2 антитіла, які інгібували утворення C3-конвертази, також, як встановлено, інгібують розщеплення C4, як описано в прикладі 10;
- 35 ФІГУРА 10 являє собою діаграму, яка ілюструє рекомбінантні поліпептиди, отримані з щурячого MASP-2, які були використані для картування епітопів анти-MASP-2 блокуючих Fab2 антитіл, як описано в прикладі 11;
- ФІГУРА 11 представляє результати, які показують зв'язування анти-MASP-2 Fab2 № 40 і № 60 з поліпептидами щурячого MASP-2, як описано в прикладі 11;
- 40 ФІГУРА 12 представляє результати, які показують кліренс азоту сечовини крові у мишей дикого типу (+/+) і мишей MASP-2 (-/-) через 24 і 48 годин після реперфузії в моделі ішемії/реперфузійного пошкодження нирки, як описано в прикладі 12;
- ФІГУРА 13A представляє результати, які показують вихідні рівні білка VEGF в RPE-хоріоїдному комплексі, отриманому від мишей дикого типу (+/+) і мишей MASP-2 (-/-), як описано в прикладі 13;
- 45 ФІГУРА 13B представляє результати, які показують рівні білка VEGF в RPE-хоріоїдному комплексі в день 3 у мишей дикого типу (+/+) і мишей MASP-2 (-/-) після індукованого лазером ушкодження в моделі дегенерації жовтої плями, як описано в прикладі 13;
- ФІГУРА 14 представляє результати, які показують середній об'єм хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV) в день сьомий після індукованого лазером ушкодження у мишей дикого типу (+/+) і мишей MASP-2 (-/-), як описано в прикладі 13;
- 50 ФІГУРИ 15A і 15B представляють криві доза-відповідь для інгібування відкладення C4b (ФІГ. 15A) і інгібування активації тромбіну (ФІГ. 15B) після введення анти-MASP-2 Fab2 антитіла в нормальній щурячій сироватці, як описано в прикладі 14;
- 55 ФІГУРИ 16A і 16B представляють виміряні показники агрегації тромбоцитів (виражені у вигляді площі агрегатів) у мишей MASP-2 (-/-) (ФІГ. 16B) порівняно з агрегацією тромбоцитів у не підданих впливу мишей дикого типу і мишей дикого типу, у яких шлях комплементу інгібований за рахунок деплеторного реагенту, фактора отрути кобри (CVF), і інгібітора термінальних компонентів шляху (антагоніста C5aR), (ФІГУРА 16A) в локалізованій реакції Шварцмана, що є моделлю дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції, як описано в прикладі
- 60

15;

ФІГУРА 17 графічно представляє рівні азоту сечовини крові (BUN), виміряні або у ДТ (+/+) (B6), або у MASP-2 (-/-), мишей-реципієнтів трансплантата донорських нирок ДТ (+/+), як описано в прикладі 16;

5 ФІГУРА 18 графічно представляє виживаність, у відсотках, мишей ДТ (+/+) і MASP-2 (-/-) залежно від кількості днів після мікробної інфекції в моделі перев'язки і проколу сліпої кишки (CLP), як описано в прикладі 17;

10 ФІГУРА 19 графічно представляє кількість бактерій, виміряну у мишей ДТ (+/+) і MASP-2 (-/-) після мікробної інфекції в моделі перев'язки і проколу сліпої кишки (CLP), як описано в прикладі 17;

ФІГУРА 20 являє собою графік Каплана-Мейера, що показує виживаність, у відсотках, мишей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-) і C3 (-/-) через шість днів після зараження шляхом інтраназального введення *Pseudomonas aeruginosa*, як описано в прикладі 18;

15 ФІГУРА 21 графічно представляє рівень відкладення C4b, виміряний у вигляді % від контролю, в зразках, отриманих в різні моменти часу після підшкірного введення або 0,3 мг/кг, або 1,0 мг/кг, мишачого анти-MASP-2 моноклонального антитіла, у мишей ДТ, як описано в прикладі 19;

20 ФІГУРА 22 графічно представляє рівень відкладення C4b, виміряний у вигляді % від контролю, в зразках, отриманих в різні моменти часу після в/ч введення 0,6 мг/кг мишачого анти-MASP-2 моноклонального антитіла, у мишей ДТ, як описано в прикладі 19;

ФІГУРА 23 графічно представляє середній об'єм хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV) в день сьомий після індукованого лазером ушкодження у мишей ДТ (+/+), що заздалегідь отримали одну в/ч ін'єкцію 0,3 мг/кг або 1,0 мг/кг мишачих анти-MASP-2 моноклонального антитіла, як описано в прикладі 20;

25 ФІГУРА 24А графічно представляє виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 (-/-) і ДТ (+/+) після інфікування $5 \times 10^8/100$ мкл КУО *N. meningitidis*, як описано в прикладі 21;

ФІГУРА 24В графічно представляє log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 КО (-/-) і ДТ (+/+), інфікованих $5 \times 10^8/100$ мкл КУО *N. meningitidis*, як описано в прикладі 21;

30 ФІГУРА 25А графічно представляє виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 КО (-/-) і ДТ (+/+) після інфікування 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*, як описано в прикладі 21;

ФІГУРА 25В графічно представляє log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей WT (+/+), інфікованих 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*, як описано в прикладі 21;

35 ФІГУРА 25С графічно представляє log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 (-/-), інфікованих 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*, як описано в прикладі 21;

40 ФІГУРА 26А графічно представляє результати аналізу відкладення C3b, які демонструють, що у мишей MASP-2 (-/-) зберігається функціональний класичний шлях, як описано в прикладі 22;

ФІГУРА 26В графічно представляє результати аналізу відкладення C3b на покритих зимозаном планшетах, які демонструють, що у мишей MASP-2 (-/-) зберігається функціональний альтернативний шлях, як описано в прикладі 22;

45 ФІГУРА 27А графічно представляє індуковану міокардіальної ішемією/реперфузійним пошкодженням (MIRI) втрату тканини після перев'язки лівої передньої низхідної гілки коронарної артерії (LAD) і реперфузії у мишей C4 (-/-) (n=6) і відповідних контрольних однопоносників ДТ (n=7), з демонстрацією ділянки, яка піддається ризику (ДПР), і розміру вогнища омертвіння (INF), як описано в прикладі 22;

50 ФІГУРА 27В графічно представляє розмір вогнища омертвіння (INF) залежно від ділянки, яка піддається ризику (ДПР), у мишей C4 (-/-) і ДТ, підданих впливу, як описано на ФІГУРІ 42А, це показує, що миші C4 (-/-) також схильні MIRI, як і контролі ДТ (пунктирна лінія), як описано в прикладі 22;

55 ФІГУРА 28А графічно представляє результати аналізу відкладення C3b з використанням сироватки від мишей ДТ, C4 (-/-) і сироватки від мишей C4 (-/-), преінкубованою з мананом, як описано в прикладі 22;

ФІГУРА 28В графічно представляє результати аналізу відкладення C3b в сироватці мишей ДТ, C4 (-/-) і MASP-2 (-/-), змішаній з мАт проти мишачого MASP-2 (мАт M11) в різних концентраціях, як описано в прикладі 22;

60 ФІГУРА 28С графічно представляє результати аналізу відкладення C3b в людській сироватці ДТ (достатня кількість C4) і дефіцитної по C4 сироватці, а також сироватці суб'єктів з

дефіцитом C4, преінкубованою з мананом, як описано в прикладі 22;

ФІГУРА 28D графічно представляє результати аналізу відкладення C3b в людській сироватці ДТ (достатня кількість C4) і сироватці суб'єктів з дефіцитом C4, змішаній з мАт проти людського MASP-2 (мАт H3), як описано в прикладі 22;

5 ФІГУРА 29A графічно представляє результати порівняльного аналізу активності C3-конвертази в плазмі від різних дефіцитних по комплементу ліній мишей, протестованих або в умовах аналізу, специфічних для лектинового шляху активації, або в умовах аналізу, специфічних для класичного шляху активації комплементу, як описано в прикладі 22;

10 ФІГУРА 29B графічно представляє кінетику з часовим розділенням активності C3-конвертази в плазмі від мишей різних дефіцитних по комплементу ліній, протестованих в умовах аналізу, специфічних для лектинового шляху активації комплементу, як описано в прикладі 22;

ФІГУРА 30 показує результати вестерн-блот аналізу, які демонструють активацію людського C3, про що свідчить наявність α' -ланцюга, тромбіновими субстратами FXIa і FXa, як описано в прикладі 23;

15 ФІГУРА 31 показує результати аналізу відкладення C3 в зразках сироватки, отриманих від мишей ДТ, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) і C4 (-/-), як описано в прикладі 23;

20 ФІГУРА 32A являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, з плином часу після впливу випромінювання в дозі 7,0 Гр для контрольних мишей і мишей, що отримували антитіло проти мишачого MASP-2 (мАт M11) або антитіло проти людського MASP-2 (мАт H6), як описано в прикладі 29;

ФІГУРА 32B являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, з плином часу після впливу випромінювання в дозі 6,5 Гр для контрольних мишей і мишей, що отримували антитіло проти мишачого MASP-2 (мАт M11) або антитіло проти людського MASP-2 (мАт H6), як описано в прикладі 29;

25 ФІГУРА 33 являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після введення інфекційної дози $2,6 \times 10^7$ КУО *N. meningitidis* серогрупи A Z2491, який демонструє, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis*, як описано в прикладі 30;

30 ФІГУРА 34 являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після введення інфекційної дози 6×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, який демонструє, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, як описано в прикладі 30;

35 ФІГУРА 35 графічно представляє log КУО/мл *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 KO і ДТ після в/ч інфікування 6×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58 ($n=3$ в різні моменти часу для обох груп мишей, результати представлені у вигляді середніх значень $\pm$ SEM); результати показують, що, хоч миші MASP-2 KO були інфіковані тією ж дозою *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, що і миші ДТ, миші MASP-2 KO мали підвищений кліренс бактерій порівняно з ДТ, як описано в прикладі 30;

40 ФІГУРА 36 графічно представляє середній бальний показник нездоров'я мишей MASP-2 і ДТ через 3, 6, 12 і 24 години після інфікування 6×10^6 КУО/100 мкл *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, що демонструє, що миші з дефіцитом MASP-2 мали високу стійкість до інфекції, з набагато більш низькими показниками нездоров'я через 6 годин, як описано в прикладі 30;

45 ФІГУРА 37 являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей після введення інфекційної дози $4 \times 10^6/100$ мкл КУО *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, з подальшим введенням через 3 години після інфікування або інгібуючого анти-MASP-2 антитіла (1 мг/кг), або контрольного по ізотипу антитіла; результати показують, що анти-MASP-2 антитіло є ефективним для лікування і підвищення виживаності у суб'єктів, інфікованих *N. meningitidis*, як описано в прикладі 31;

50 ФІГУРА 38 графічно представляє log КУО/мл життєздатних бактерій *N. meningitidis* серогрупи B-MC58, витягнутих в різні моменти часу з людської сироватки з концентрацією 20 % після в/ч інфікування $6,5 \times 10^6$ КУО/100 мкл *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, через 0, 30, 60 і 90 хвилин після інкубації в присутності: (A) нормальної людської сироватки (НЛС) плюс людське анти-MASP-2 антитіло; (B) нормальної людської сироватки (НЛС) плюс контрольне по ізотипу антитіло; (C) MBL-/- людської сироватки; (D) нормальної людської сироватки (НЛС) і (E) інактивованої нагріванням нормальної людської сироватки (НЛС); результати показують, що залежне від комплементу знищення *N. meningitidis* в людській сироватці було значно підвищено при додаванні людського анти-MASP-2 антитіла, як описано в прикладі 32;

60 ФІГУРА 39 графічно представляє log КУО/мл життєздатних бактерій *N. meningitidis* серогрупи B-MC58, витягнутих в різні моменти часу із зразків мишачої сироватки; результати

показують, що сироватка мишей MASP-2/- має більш високий рівень бактерицидної активності відносно *N. meningitidis*, ніж сироватка мишей ДТ, як описано в прикладі 32;

5 ФІГУРА 40 графічно представляє гемоліз (визначений на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих мишачих еритроцитів (Crry/C3-/-) в супернатант, виміряного фотометричним методом) покритих мананом мишачих еритроцитів людською сироваткою в діапазоні концентрацій сироватки. Протестовані сироватки включали інактивовану нагріванням (IH) НЛС, MBL-/-, НЛС+анти-MASP-2 антитіло і НЛС контроль, як описано в прикладі 33;

10 ФІГУРА 41 графічно представляє гемоліз (визначений на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих еритроцитів мишей ДТ в супернатант, виміряного фотометричним методом) не покритих мишачих еритроцитів людською сироваткою в діапазоні концентрацій сироватки. Протестовані сироватки включали інактивовану нагріванням (IH) НЛС, MBL-/-, НЛС+анти-MASP-2 антитіло і НЛС контроль; результати показують, що інгібування MASP-2 інгібує опосередкований комплементом лізис еритроцитів не сенсibiliзованих мишей ДТ, як описано в прикладі 33;

15 ФІГУРА 42 графічно представляє гемоліз (визначений на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих мишачих еритроцитів (CD55/59-/-) в супернатант, виміряного фотометричним методом) не покритих мишачих еритроцитів людською сироваткою в діапазоні концентрацій сироватки. Протестовані сироватки включали інактивовану нагріванням (IH) НЛС, MBL-/-, НЛС+анти-MASP-2 антитіло і НЛС контроль, як описано в прикладі 33;

20 ФІГУРА 43 графічно представляє виживаність, у відсотках, залежно від часу (дні) після впливу випромінювання в дозі 8,0 Гр для контрольних мишей і мишей, що отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6), як описано в прикладі 34;

25 ФІГУРА 44 графічно представляє час до початку мікровазкулярної оклюзії після ін'єкції LPS мишам MASP-2/- і ДТ; показана процентна частка мишей з утворенням тромбів, виміряним протягом 60 хвилин; результати показують, що утворення тромбів відбувається через 15 хвилин у мишей ДТ, при цьому у аж до 80 % мишей ДТ відбувається утворення тромбів за 60 хвилин; навпаки, у жодної з мишей MASP-2/- не спостерігали утворення тромбів протягом 60-хвилинного періоду часу (логарифмічний ранговий критерій: $p=0,0005$), як описано в прикладі 35;

30 ФІГУРА 45 графічно представляє виживаність, у відсотках, для контрольних мишей ($n=5$) і анти-MASP-2, що отримували антитіло мишей ($n=5$) в моделі STX/LPS-індукувати HUS з плином часу (години); результати показують, що всі контрольні миші загинули через 42 години, при цьому, навпаки, 100 % анти-MASP-2, що отримували антитіло мишей виживали протягом всього експерименту, як описано в прикладі 36;

35 ФІГУРА 46 графічно представляє, у вигляді функції від часу після індукції пошкодження, процентну частку мишей з мікровазкулярною оклюзією в моделі індукованого FITC/декстраном і УФ пошкодження після обробки контрольним по ізотипу антитілом або антитілом проти людського MASP-2 мАт Н6 (10 мг/кг), введенням за 16 годин і 1 годину до ін'єкції FITC/декстрану, як описано в прикладі 37;

40 ФІГУРА 47 графічно представляє час до оклюзії, в хвилинах, для мишей, що отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6) і контрольне по ізотипу антитіло, при цьому дані представлені у вигляді діаграми розкиду із середніми значеннями (горизонтальні межі) і планками стандартних погрешностей (вертикальні межі). Для статистичного аналізу даних використовували непарний критерій Стьюдента; при цьому символ "*" відповідає $p=0,0129$, як описано в прикладі 37; і

45 ФІГУРА 48 графічно представляє час до оклюзії, в хвилинах, для мишей дикого типу, мишей MASP-2 KO і мишей дикого типу, що попередньо отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6), введення в/ч в дозі 10 мг/кг за 16 годин до, і знову за 1 годину до, індукції тромбозу в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин при низькій інтенсивності світла (800-1500), як описано в прикладі 37;

50 ФІГУРА 49 являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує процентну частку мишей з тромбами, залежно від часу, в моделі індукованої FITC-декстраном тромботичної мікроангіопатії у мишей, що отримували зростаючі дози людського інгібуючого MASP-2 антитіла (мАт Н6), або контрольне по ізотипу антитіло, як описано в прикладі 39;

55 ФІГУРА 50 графічно представляє середній час (хвилини) до початку утворення тромбів залежно від дози мАт Н6 ($*p<0,01$ порівняно з контролем), як описано в прикладі 39;

60 ФІГУРА 51 являє собою графік Каплана-Мейєра, що показує процентну частку мишей з мікровазкулярною оклюзією, залежно від часу, в моделі індукованої FITC-декстраном тромботичної мікроангіопатії у мишей, що отримували зростаючі дози інгібуючого людський MASP-2 антитіла (мАт Н6), або контрольне по ізотипу антитіло, як описано в прикладі 39;

ФІГУРА 52 графічно представляє середній час до мікроваскулярної оклюзії залежно від дози мАт Н6 (* $p < 0,05$ порівняно з контролем), як описано в прикладі 39;

5 ФІГУРА 53А графічно представляє рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності людського моноклонального антитіла проти MASP-2 (OMS646) в умовах аналізу, специфічних для лектинового шляху; результати показують, що OMS646 інгібує опосередковане лектином відкладення MAC з величиною IC_{50} , що становить приблизно 1 нМ, як описано в прикладі 40;

10 ФІГУРА 53В графічно представляє рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності людського моноклонального антитіла проти MASP-2 (OMS646) в умовах аналізу, специфічних для класичного шляху; результати показують, що OMS646 не інгібує опосередковане класичним шляхом відкладення MAC, як описано в прикладі 40;

15 ФІГУРА 53С графічно представляє рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності людського моноклонального антитіла проти MASP-2 (OMS646) в умовах аналізу, специфічних для альтернативного шляху; результати показують, що OMS646 не інгібує опосередковане альтернативним шляхом відкладення MAC, як описано в прикладі 40;

20 ФІГУРА 54 графічно представляє фармакокінетичний (ФК) профіль людського моноклонального антитіла проти MASP-2 (OMS646) у мишей, що показує концентрацію OMS646 (середнє для $n=3$ тварин/групи) залежно від часу після введення у вказаній дозі, як описано в прикладі 40;

25 ФІГУРА 55А графічно представляє фармакодинамічну (ФД) відповідь на людське моноклональне антитіло проти MASP-2 (OMS646), вимірювану у вигляді падіння системної активності лектинового шляху у мишей після внутрішньовенного введення, як описано в прикладі 40;

30 ФІГУРА 55В графічно представляє фармакодинамічну (ФД) відповідь на людське моноклональне антитіло проти MASP-2 (OMS646), вимірювану у вигляді падіння системної активності лектинового шляху у мишей після підшкірного введення, як описано в прикладі 40;

35 ФІГУРА 56 графічно представляє інгібуючий ефект анти-MASP-2 антитіла (OMS646) порівняно з sCR1 на індуковане aHUS сироваткою відкладення C5b-9 на АДФ-активованих клітинах HMEC-1, як описано в прикладі 41;

40 ФІГУРА 57 графічно представляє інгібуючий ефект анти-MASP-2 антитіла (OMS646) порівняно з sCR1 на індуковане aHUS сироваткою утворення тромбів на АДФ-активованих клітинах HMEC-1, як описано в прикладі 42;

45 ФІГУРА 58 графічно представляє середню зміну кількості тромбоцитів від вихідного значення залежно від часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, тромботичну мікроангіопатію (HSCT-TMA), після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 46;

50 ФІГУРА 59 графічно представляє середню зміну рівня LDH від вихідного значення залежно від часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-TMA, після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 46;

55 ФІГУРА 60 графічно представляє середню зміну рівня гаптоглобіну від вихідного значення залежно від часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-TMA, після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 46;

60 ФІГУРА 61 показує течію хвороби у пацієнта після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT), у якого розвинулася HSCT-TMA і реакція трансплантат проти хазяїна (GVHD); спостерігається ослаблення HSCT-TMA, GVHD і ослаблення неврологічних симптомів після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 47;

65 ФІГУРА 62А графічно представляє рівень креатиніну залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнта № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 48;

70 ФІГУРА 62В графічно представляє рівень гаптоглобіну залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнта № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 48;

75 ФІГУРА 62С графічно представляє рівень гемоглобіну залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнта № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 48;

80 ФІГУРА 62D графічно представляє рівень LDH залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнта № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 48; і

85 ФІГУРА 62Е графічно представляє рівень тромбоцитів залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнта № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2

антитілом (OMS646), як описана в прикладі 48.

ОПИС СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 кДНК MAr19 людини

SEQ ID NO: 2 білок MAr19 людини (з лідером)

5 SEQ ID NO: 3 білок MAr19 людини (зрілий)

SEQ ID NO: 4 кДНК MASP-2 людини

SEQ ID NO: 5 білок MASP-2 людини (з лідером)

SEQ ID NO: 6 білок MASP-2 людини (зрілий)

SEQ ID NO: 7 гДНК MASP-2 людини (екзони 1-6)

10 АНТИГЕННІ: (ЗАСТОСОВНО ДО ЗРІЛОГО БІЛКА MASP-2)

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

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

SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (ак 1-293)

SEQ ID NO: 11 область EGF (ак 122-166)

15 SEQ ID NO: 12 домен серинової протеази (ак 429-671)

SEQ ID NO: 13 неактивний домен серинової протеази (ак 610-625 з мутацією Ser618 на Ala)

SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUB1)

SEQ ID NO: 15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI)

SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (центр MBL-зв'язувальної області)

20 SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL-зв'язувальна область)

SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (пептид EGF)

SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSRGDSGGALV (центр зв'язування серинової протеази)

ПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ:

SEQ ID NO: 20 повнорозмірна кДНК MBL

25 SEQ ID NO: 21 повнорозмірний білок MBL

SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP (консенсусна послідовність зв'язування)

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

30 SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPOGKLGPOG

SEQ ID NO: 27 GAOGSOGKGAOGPPGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-фіколін людини)

SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO

(фіколін р35 людини)

SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (сайт розщеплення C4)

35 ІНГІБІТОРИ ЕКСПРЕСІЇ:

SEQ ID NO: 30 кДНК домену CUBI-EGF (нуклеотиди 22-680 в SEQ ID NO: 4)

SEQ ID NO: 31

5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' Нуклеотиди 12-45 в SEQ ID NO: 4,

включаючи сайт початку трансляції MASP-2 (смислова)

40 SEQ ID NO: 32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' Нуклеотиди 361-396 в SEQ ID NO: 4,

що кодують ділянку, яка включає сайт зв'язування MBL MASP-2 (смислова)

SEQ ID NO: 33

5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' Нуклеотиди 610-642 в SEQ ID NO: 4,

45 що кодують ділянку, яка включає домен CUBII

ПРАЙМЕРИ ДЛЯ КЛОНУВАННЯ:

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

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

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

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

SEQ ID NO: 38-47 являють собою праймери для клонування гуманізованого антитіла

SEQ ID NO: 48 являє собою 9-ак зв'язувальну пептид

ЕКСПРЕСІЙНИЙ ВЕКТОР:

SEQ ID NO: 49 являє собою вставку мінігена MASP-2

55 SEQ ID NO: 50 являє собою кДНК MASP-2 миші

SEQ ID NO: 51 являє собою білок MASP-2 миші (з лідером)

SEQ ID NO: 52 являє собою зрілий білок MASP-2 миші

SEQ ID NO: 53 являє собою кДНК MASP-2 щура

SEQ ID NO: 54 являє собою білок MASP-2 щура (з лідером)

60 SEQ ID NO: 55 являє собою зрілий білок MASP-2 щура

SEQ ID NO: 56-59 являють собою олігонуклеотиди для сайт-направленого мутагенезу MASP-2 людини, використані для отримання MASP-2A людини

SEQ ID NO: 60-63 являють собою олігонуклеотиди для сайт-направленого мутагенезу MASP-2 миші, використані для отримання MASP-2A миші

5 SEQ ID NO: 64-65 являють собою олігонуклеотиди для сайт-направленого мутагенезу MASP-2 щура, використані для отримання MASP-2A щура

SEQ ID NO: 66 ДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) (без сигнального пептиду) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

10 SEQ ID NO: 67 поліпептид варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 68 поліпептид варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) 17N16mc

SEQ ID NO: 69: ДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

15 SEQ ID NO: 70: поліпептид варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 71: поліпептид варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) 17N16_dc17N9

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

20 Даний винахід оснований на дивному відкритті авторів винаходу, що полягає в тому, що можливе інгібування опосередкованого MASP-2 лектинового шляху зі збереженням без зміни класичного шляху. Даний винахід також стосується використання MASP-2 як терапевтичної мішені для інгібування пошкодження клітин, пов'язаного з опосередкованим лектином шляхом активації комплементу, зі збереженням без зміни компонента класичного (C1q-залежного) шляху імунної системи.

I. Визначення

25 Якщо немає інших вказівок, всі терміни, що використовуються в цьому документі, мають те значення, яке їм звичайно надають фахівці в галузі, до якої належить даний винахід. Наступні визначення наведені з метою забезпечення ясності відносно термінів, що використовуються в описі і формулі винаходу для опису даного винаходу.

30 Використовуваний в цьому документі термін "MASP-2-залежна активація комплементу" означає MASP-2-залежну активацію лектинового шляху, яка відбувається в фізіологічних умовах (тобто, в присутності Ca^{++}), приводячи до утворення C3-конвертази C4b2a лектинового шляху, і після накопичення продукту розщеплення C3, C3b, до подальшого утворення C5-конвертази C4b2a(C3b)n, яка була визнана основною причиною опсонізації.

35 Використовуваний в цьому документі термін "альтернативний шлях" означає активацію комплементу, яка запускається, наприклад, зимозаном з клітинної стінки грибків і дріжджів, ліпополісахаридом (LPS) із зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій і кролячими еритроцитами, а також багатьма чистими полісахаридами, кролячими еритроцитами, вірусами, бактеріями, клітинами пухлин тваринних, паразитами і пошкодженими клітинами, і яка, як прийнято вважати, виникає внаслідок спонтанної протеолітичного утворення C3b з фактора 40 комплементу C3.

Використовуваний в цьому документі термін "лектиновий шлях" означає активацію комплементу, яка відбувається внаслідок специфічного зв'язування сироваткових і не сироваткових вуглевод-зв'язувальних білків, включаючи манан-зв'язувальний лектин (MBL), CL-11 і фіколіні (Н-фіколін, М-фіколін або L-фіколін).

45 Використовуваний в цьому документі термін "класичний шлях" означає активацію комплементу, яка запускається в результаті зв'язування антитіла з чужорідною частинкою, і для якої необхідно зв'язування молекули впізнавання C1q.

Використовуваний в цьому документі термін "інгібуючий MASP-2 засіб" означає будь-який засіб, який зв'язується, або безпосередньо взаємодіє, з MASP-2 і ефективно інгібує MASP-2-залежну активацію комплементу, включаючи анти-MASP-2 антитіла і їх MASP-2-зв'язувальні фрагменти, природні і синтетичні пептиди, малі молекули, розчинні рецептори MASP-2, інгібітори експресії і виділені природні інгібітори, і також охоплює пептиди, які конкурують з MASP-2 за зв'язування з іншою молекулою впізнавання (такий як, наприклад, MBL, Н-фіколін, М-фіколін або L-фіколін) в лектиновому шляху, але не охоплює антитіла, які зв'язують такі інші молекули впізнавання. Інгібуючі MASP-2 засоби, корисні в способі за винаходом, можуть зменшувати MASP-2-залежну активацію комплементу на більше ніж 20 %, наприклад, на більше ніж 50 %, наприклад, на більше ніж 90 %. У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб зменшує MASP-2-залежну активацію комплементу на більше ніж 90 % (тобто, результатом є MASP-2-залежна активація комплементу на рівні лише 10 % або менше).

60 Використовуваний в цьому документі термін "антитіло" охоплює антитіла і фрагменти

антитіл, отримані від будь-якого ссавця, який продукує антитіла (наприклад, миші, щура, кролика і примата, включаючи людину), або з гібридами, в результаті фагової селекції, рекомбінантної експресії або від трансгенних тварин (або з використанням інших методів отримання антитіл або фрагментів антитіл), які специфічно зв'язують поліпептид-мішень, такий як, наприклад, MASP-2, його поліпептиди або частини. Термін "антитіло" не повинен бути обмежений відносно джерела антитіла або способу, яким воно отримане (наприклад, з використанням гібридом, фагової селекції, рекомбінантної експресії, трансгенної тварини, пептидного синтезу і так далі). Ілюстративні антитіла включають поліклональні, моноклональні і рекомбінантні антитіла; пан-специфічні, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, триспецифічні антитіла); гуманізовані антитіла; мишачі антитіла; химерні, мишачі-людські, мишачі-приматні, приматні-людські моноклональні антитіла; а також антиідіотипічні антитіла, і можуть являти собою будь-яке інтактне антитіло, або його фрагмент. Використовуваний в цьому документі термін "антитіло" охоплює не тільки інтактні поліклональні або моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), однокланцюжкові фрагменти (scFv), їх синтетичні варіанти, природні варіанти, злиті білки, що містять частину антитіла з антигензв'язувальним фрагментом потрібної специфічності, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, а також будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка містить антигензв'язувальний сайт або фрагмент (сайт впізнавання епітопа) потрібної специфічності.

Термін "моноклональне антитіло" означає гомогенну популяцію антитіл, при цьому моноклональне антитіло складається з амінокислот (природних і неприродних), які беруть участь у вибіркового зв'язуванні епітопа. Моноклональні антитіла є високоспецифічними для антигена-мішені. Термін "моноклональне антитіло" охоплює не тільки інтактні моноклональні антитіла і повнорозмірні моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), однокланцюжкові фрагменти (scFv), їх варіанти, злиті білки, що містять антигензв'язувальну частину, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла, а також будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка містить антигензв'язувальний фрагмент (сайт впізнавання епітопа) потрібної специфічності і має здатність зв'язувати епітоп. Термін не повинен бути обмежений відносно джерела антитіла або способу, яким воно отримане (наприклад, з використанням гібридом, фагової селекції, рекомбінантної експресії, трансгенних тварин і так далі). Термін охоплює цілі імуноглобуліни, а також фрагменти, і так далі, описані вище при роз'ясненні терміну "антитіло".

Використовуваний в цьому документі термін "фрагмент антитіла" означає частину, отриману з, або похідну від, повнорозмірного антитіла, такого як, наприклад, анти-MASP-2 антитіло, як правило, що включає його антигензв'язувальну або варіабельну область. Ілюстративні приклади фрагментів антитіла включають фрагменти Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ і Fv, фрагменти scFv, діатіла, лінійні антитіла, молекули однокланцюжкових антитіл, а також мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

Використовуваний в цьому документі термін "однокланцюжковий Fv", або "scFv", фрагмент антитіла містить домени VH і VL антитіла, причому ці домени розташовані на одному поліпептидному ланцюгу. Як правило, поліпептид Fv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами VH і VL, який дозволяє scFv формувати потрібну структуру для зв'язування антигена.

Використовуваний в цьому документі термін "химерне антитіло" означає рекомбінантний білок, який містить варіабельні домени і ділянки, які визначають комплементарність, з антитіл видів, відмінних від людини (наприклад, гризунів), в той час як інша частина молекули антитіла походить з людського антитіла.

Використовуваний в цьому документі термін "гуманізоване антитіло" означає химерне антитіло, яке містить мінімальну послідовність, яка відповідає ділянкам, які визначають специфічність, імуноглобуліну, що не належить людині, яка вставлена в каркас людського антитіла. Гуманізовані антитіла, як правило, являють собою рекомбінантні білки, в яких тільки ділянки, які визначають комплементарність, антитіла походять не з антитіла людини.

Використовуваний в цьому документі термін "манан-зв'язувальний лектин" ("MBL") еквівалентний терміну "манан-зв'язувальний білок" ("MBP").

Використовуваний в цьому документі термін "мембраноатакуючий комплекс" ("MAC") означає комплекс з п'яти термінальних компонентів комплексу (C5b в поєднанні з C6, C7, C8 і C-9), який вбудовується в, і руйнує, мембрани (інша назва C5b-9).

Використовуваний в цьому документі термін "суб'єкт" включає всіх ссавців, в тому числі, без обмеження, людей, приматів, собак, кішок, коней, овець, кіз, корів, кроликів, свинь і гризунів.

При використанні в цьому документі амінокислотні залишки мають наступні скорочення:

аланін (Ala; A), аспарагін (Asn; N), аспарагінова кислота (Asp; D), аргінін (Arg; R), цистеїн (Cys; C), глутамінова кислота (Glu; E), глутамін (Gln; Q), гліцин (Gly; G), гістидин (His; H), ізолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лізин (Lys; K), метіонін (Met; M), фенілаланін (Phe; F), пролін (Pro; P), серин (Ser; S), треонін (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) і валін (Val; V).

У найширшому значенні природні амінокислоти можна розділяти на групи на основі хімічних характеристик бічних ланцюгів відповідних амінокислот. До "гідрофобних" амінокислот належать Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys або Pro. До "гідрофільних" амінокислот належать Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg або His. Ця група амінокислот може бути додатково розділена на підкласи таким чином. До "незаряджених гідрофільних" амінокислот належать Ser, Thr, Asn або Gln. До "кислих" амінокислот належать Glu або Asp. До "основних" амінокислот належать Lys, Arg або His.

Використовуваний в цьому документі термін "консервативна амінокислотна заміна" означає взаємну заміну амінокислот всередині кожної з наступних груп: (1) гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин, (2) фенілаланін, тирозин і триптофан, (3) серин і треонін, (4) аспартат і глутамат, (5) глутамін і аспарагін, і (6) лізин, аргінін і гістидин.

Використовуваний в цьому документі термін "олігонуклеотид" означає олігомер або полімер рибонуклеїнової кислоти (РНК) або дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), або їх міметики. Цей термін також охоплює олігонуклеотиди, що складаються з природних нуклеотидів, залишків цукру і ковалентних міжнуклеозидних (каркасних) зв'язків, а також олігонуклеотиди, що мають неприродні модифікації.

Використовуваний в цьому документі термін "епітоп" означає сайт на білку (наприклад, людському білку MASP-2), який зв'язує антитіло. "Епітопи, які перекриваються" включають щонайменше один (наприклад, два, три, чотири, п'ять або шість) загальних амінокислотних залишків, включаючи лінійні і нелінійні епітопи.

У цьому документі терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються взаємозамінно і означають будь-яку зв'язаний пептидними зв'язками ланцюг амінокислот, незалежно від довжини або пост-трансляційної модифікації. Білок MASP-2, описаний в цьому документі, може містити, або являти собою, білок дикого типу, або може являти собою варіанти, які можуть мати не більше 50 (наприклад, не більше однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 або 50) консервативних амінокислотних заміни. Консервативні заміни, як правило, включають заміни всередині наступних груп: гліцин і аланін; валін, ізолейцин і лейцин; аспарагінова кислота і глутамінова кислота; аспарагін, глутамін, серин і треонін; лізин, гістидин і аргінін; і фенілаланін і тирозин.

У деяких варіантах здійснення людський білок MASP-2 може мати амінокислотну послідовність, яка на, або більше ніж на, 70 (наприклад, 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, або 100) % ідентична людському білку MASP-2, що має амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 5.

У деяких варіантах здійснення пептидні фрагменти можуть мати довжину щонайменше 6 (наприклад, щонайменше 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 або 600, або більше) амінокислотних залишків (наприклад, щонайменше 6 послідовних амінокислотних залишків в SEQ ID NO: 5). У деяких варіантах здійснення антигенний пептидний фрагмент людського білка MASP-2 має довжину менше 500 (наприклад, менше 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 або 6) амінокислотних залишків (наприклад, менше 500 послідовних амінокислотних залишків в SEQ ID NO: 5).

Процент (%) ідентичності амінокислотних послідовностей визначають як процентну частку амінокислот в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотам в еталонній послідовності після вирівнювання послідовностей і внесення делецій, при необхідності, для досягнення максимального процента ідентичності послідовностей. Вирівнювання для цілей визначення процента ідентичності послідовностей можна виконувати різними методами, які відомі фахівцям в даній галузі, наприклад, з використанням загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як програми BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 або Megalign (DNASTAR). Відповідні параметри для визначення вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимально оптимального вирівнювання по всій довжині порівнюваної послідовності, можна визначати відомими способами.

II. Суть винаходу

Лектини (MBL, М-фіколін, Н-фіколін, L-фіколін і CL-11) являють собою специфічні молекули

впізнання, які запускають вроджену систему комплементу, і система включає лектиновий шлях ініціації і пов'язаний цикл ампліфікації термінального шляху, який посилює ініційовану лектинами активацію термінальних ефекторних молекул комплементу. C1q являє собою специфічну молекулу впізнання, яка запускає набуту систему комплементу, і система

5 включає класичний шлях ініціації і зв'язаний цикл ампліфікації термінального шляху, який посилює ініційовану C1q активацію термінальних ефекторних молекул комплементу. Автори винаходу називають ці дві основні системи активації комплементу лектин-залежною системою комплементу і C1q-залежною системою комплементу, відповідно.

Крім її важливої ролі в імунному захисті, система комплементу сприяє пошкодженню тканин

10 при багатьох клінічних станах. Таким чином, існує гостра потреба в розробці терапевтично ефективних інгібіторів комплементу для запобігання цим несприятливим ефектам. З визнанням можливості інгібування опосередкованого MASP-2 лектинового шляху, не торкаючись при цьому класичного шляху, приходить розуміння того, що було б надто бажано специфічно інгібувати лише систему активації комплементу, що викликає конкретну патологію, без повного

15 відключення здатності комплементу до імунного захисту. Наприклад, при хворобливих станах, в яких активація комплементу опосередковується переважно лектин-залежною системою комплементу, було б корисно специфічно інгібувати тільки цю систему. Це дозволило б зберігати C1q-залежну систему активації комплементу інтактною для можливості процесингу імунних комплексів і участі в захисті хазяїна від інфекції.

Переважає білковим компонентом-мішенню при розробці лікарських засобів для специфічного інгібування лектин-залежної системи комплементу є MASP-2. З усіх відомих білкових компонентів лектин-залежної системи комплементу (MBL, Н-фіколін, М-фіколін, L-фіколін, MASP-2, C2-C9, фактор В, фактор D і пропердин) лише MASP-2 є унікальним для лектин-залежної системи комплементу і необхідним для функціонування цієї системи. Лектини

20 (MBL, Н-фіколін, М-фіколін, L-фіколін і CL-11) також є унікальними компонентами в лектин-залежній системі комплементу. Однак втрата будь-якого з цих лектинових компонентів не обов'язково приводить до інгібування активації системи в результаті лектинової надмірності. Було б необхідно інгібувати всі п'ять лектинів для гарантованого інгібування лектин-залежної системи активації комплементу. Крім того, оскільки MBL і фіколіни, як відомо, також мають

25 опсонічну активність, незалежну від комплементу, інгібування функції лектинів привело б до втрати цього корисного механізму захисту хазяїна від інфекції. Навпаки, ця незалежна від комплементу опсонічна активність лектинів залишилася б незачепленою, якби мішенню інгібування був білок MASP-2. Додатковою перевагою MASP-2 як терапевтичної мішені для інгібування лектин-залежної системи активації комплементу є те, що концентрація в плазмі

30 MASP-2 є однією з найнижчих для білків комплементу (≈ 500 нг/мл); таким чином, відповідно низькі концентрації високоафінних інгібіторів MASP-2 можуть бути достатніми для досягнення повного інгібування (Moller-Kristensen, M., et al., J. Immunol. 156:159-167, 2003).

III. Роль MASP-2 в тромботичних мікроангіопатіях і способи лікування з використанням інгібуючих MASP-2 засобів

Огляд

Тромботична мікроангіопатія (ТМА) являє собою патологію, що характеризується утворенням кров'яних згустків в дрібних кровоносних судинах (Benz, K.; et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 19(3):242-7 (2010)). Основною причиною вважають стрес або ушкодження основного ендотелію судин. Клінічні і лабораторні показники ТМА включають тромбоцитопенію, анемію,

45 пурпуру і ниркову недостатність. Класичними ТМА є гемолітичний уремичний синдром (HUS) і тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП). Характерною основоположною патологічною ознакою ТМА є активація тромбоцитів і утворення мікротромбів в дрібних артеріолах і венулах. Активація комплементу, що ініціюється, щонайменше частково, пошкодженням або стресом ендотелію мікросудин, також залучена в інші ТМА, включаючи катастрофічний антифосфоліпідний синдром (CAPS), системну хворобу Дегоса, а також ТМА в результаті раку, протиракової хіміотерапії і трансплантації.

Прямий доказ патологічної ролі комплементу в різних формах нефриту отриманий при вивченні пацієнтів з генетичним дефіцитом певних компонентів комплементу. У ряді робіт встановлений зв'язок пошкодження нирок з дефіцитом регуляторного фактора Н комплементу

55 (Ault, B.H., Nephrol. 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., Nat. Genet. 31:424-8, 2002). Дефіцит фактора Н приводить до низьких рівнів в плазмі фактора В і С3 внаслідок пов'язаного з активацією поглинання цих компонентів. Циркуючі рівні C5b-9 також підвищені в сироватці таких пацієнтів, що передбачає активацію комплементу. Мембранозно-проліферативний гломерулонефрит (MPGN) і ідіопатичний гемолітичний уремичний синдром (HUS) пов'язані з дефіцитом фактора Н або мутаціями фактора Н. Свині з

60

дефіцитом фактора Н (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) і миші з нокаутом фактора Н (Pickering, M.C., 2002) виявляють MPGN-подібні симптоми, що підтверджує важливість фактора Н в регуляції комплементу. Дефіцит інших компонентів комплементу пов'язаний з нирковою недостатністю, яка виникає внаслідок системного червоного вовчачка (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). Дефіцит C1q, C4 і C2 є сильним фактором схильності до розвитку SLE по механізмах, пов'язаних з порушенням кліренсу імунних комплексів і апоптотичного матеріалу. У багатьох з цих пацієнтів з SLE розвивається вовчаковий нефрит, що характеризується відкладенням імунних комплексів у всій клубочковій зоні.

aHUS

Атиповий гемолітичний уремичний синдром (aHUS) стосується групи станів, які називаються "тромботичними мікроангіопатіями". У випадку атипової форми HUS (aHUS) захворювання пов'язане з порушеною регуляцією комплементу, і може бути або спорадичним, або сімейним. Сімейні випадки aHUS пов'язані з мутаціями в генах, що кодують білки, відповідальні за активацію комплементу або регуляцію комплементу, включаючи фактор Н, фактор І, фактор В комплементу, мембранний кофактор CD46, а також зв'язаний з фактором Н комплементу білок 1 (CFHR1) і зв'язаний з фактором Н комплементу білок 3 (CFHR3). (Zipfel, P.F., et al., *PLoS Genetics* 3(3):e41 (2007)). Об'єднуючою межею цього різноманітного набору генетичних мутацій, пов'язаних з aHUS, є схильність до підвищеної активації комплементу на клітинних або тканинних поверхнях. Таким чином, один аспект даного винаходу стосується лікування пацієнта, який страждає на aHUS, пов'язаного з дефіцитом фактора Н, шляхом введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 засобу. Інший аспект даного винаходу стосується лікування пацієнта, який страждає на HUS, пов'язаного з дефіцитом фактора І, фактора В, мембранного кофактора CD46, CFHR1 або CFHR3, шляхом введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 засобу.

Останнім часом досягнутий значний прогрес в розумінні молекулярної патофізіології, яка лежить в основі підвищеної активації комплементу при aHUS, що викликається різним набором мутантних факторів комплементу. Найкраще вивчений механізм для мутацій фактора Н. Фактор Н є білком, який достатньо присутній в сироватці, що містить 20 доменів коротких консенсусних повторів (SCR), який діє як негативний регулятор активації комплементу як в розчині, так і на поверхні клітини-хазяїна. Він спрямований на активовану форму C3, і, спільно з фактором І і іншими кофакторами, стимулює його інактивацію, перешкоджаючи подальшій активації комплементу. Для ефективного контролю активації комплементу на поверхні клітини-хазяїна фактор Н повинен взаємодіяти з клітинами-хазяїнами, що опосередковується доменами 16-20 SCR. Всі пов'язані з aHUS мутації фактора Н, описані до цього часу, сконцентровані в С-кінцевій області, що охоплює домени 16-20 (SCR). Ці мутантні білки фактора Н є повністю функціональними для контролю активації C3 в розчині, але нездатні до взаємодії з поверхнею клітини-хазяїна і, отже, нездатні контролювати активацію C3 на клітинних поверхнях (Exp Med 204(6):1249-56 (2007)). Таким чином, деякі мутації фактора Н пов'язані з aHUS, оскільки мутантний білок фактора Н нездатний взаємодіяти з поверхнями клітин-хазяїв і, отже, нездатний до ефективної знижувальної регуляції активації комплементу на поверхнях клітин-хазяїв, включаючи мікроваскулярний ендотелій. У результаті після початкової активації C3 подальша активація комплементу на поверхні мікроваскулярного ендотелію не слабшає у пацієнтів з мутаціями фактора Н. Така неконтрольована активація комплементу зрештою приводить до прогресуючого пошкодження судинного ендотелію, подальшої агрегації тромбоцитів і мікросудинної коагуляції, а також гемолізу, що викликається силою зсуву при проходженні еритроцитів через частково перекриті мікросудини. Таким чином, вияви захворювання aHUS, а також клінічні і лабораторні показники напряму пов'язані з порушенням негативної регуляції комплементу на поверхні мікроваскулярного ендотелію.

Аналогічно мутації фактора Н, мутації з втратою функції в негативних модуляторах комплементу, фактора І і мембранному кофакторі (CD46), також пов'язані з aHUS. Зворотна ситуація була виявлена для білків фактора В і C3, в цьому випадку aHUS, як встановлено, пов'язаний з мутаціями набуття функції в цих білках (Pediatr Nephrol 25(12):2431-42 (2010)). Таким чином, сукупність даних вказує на участь активації комплементу в патогенезі aHUS. Цей висновок найбільш переконливо підтверджує терапевтична ефективність екулізумабу, моноклонального антитіла, що блокує термінальний білок C5 комплементу, в лікуванні aHUS.

При тому, що центральна роль комплементу як ефекторного механізму в aHUS широко визнана, тригери, що ініціюють активацію комплементу, і залучені молекулярні шляхи не визначені. Не у всіх людей, що мають описані вище мутації, розвивається aHUS. Фактично, сімейні дослідження показали, що пенетрантність aHUS становить всього ~50 %. (Ann Hum

Genet 74(1):17-26 (2010)). Природна динаміка захворювання вказує на те, що aHUS найчастіше розвивається після початкової події, такої як інфекційне захворювання або пошкодження. Добре відомо, що збудники інфекції активують систему комплементу. При відсутності адаптивного імунітету, що раніше існував, активація комплементу збудниками інфекції може переважно ініціюватися через лектиновий шлях. Таким чином, активація лектинового шляху, що запускається інфекцією, може являти собою початковий тригер для подальшого патологічного посилення активації комплементу у схильних до aHUS індивідуумів, що в результаті може приводити до прогресування захворювання. Відповідно, інший аспект даного винаходу стосується лікування пацієнта, який страждає на aHUS, пов'язаного з інфекцією, шляхом введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 засобу.

Інші види пошкодження тканин хазяїна також будуть активувати комплемент через лектиновий шлях, зокрема, пошкодження судинного ендотелію. Ендотеліальні клітини судин людини, піддані окиснювальному стресу, наприклад, відповідають експресією поверхневих молекул, які зв'язують лектини і активують лектиновий шлях комплементу (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). Пошкодження судин після ішемії/реперфузії також приводить до активації комплементу через лектиновий шлях *in vivo* (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). Активація лектинового шляху в цих умовах має патологічні наслідки для хазяїна, і інгібування лектинового шляху за рахунок блокування MASP-2 запобігає подальшому пошкодженню тканин хазяїна і несприятливим результатам (Schwaebble PNAS 2011).

Таким чином, відомо, що і інші процеси, що провокують aHUS, також активують лектиновий шлях комплементу. Внаслідок цього, ймовірно, що лектиновий шлях може являти собою вихідний механізм активації комплементу, який неадекватно посилюється нерегульованим чином у людей, генетично схильних до aHUS, таким чином, ініціюючи патогенез aHUS. Можна зробити висновок, що засоби, які блокують активацію комплементу через лектиновий шлях, включаючи анти-MASP-2 антитіла, ймовірно будуть запобігати прогресуванню захворювання або зменшувати загострення у схильних до aHUS індивідуумів.

У підтримку даної концепції, в нещодавніх дослідженнях була ідентифікована *S. pneumonia* як важливий етіологічний агент у випадках aHUS у дітей. (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). Ця конкретна етіологія, судячи з всього, має несприятливий прогноз зі значною смертністю і тривалим тяжким станом. Примітно, що ці випадки включали не ентеральну інфекцію, що приводить до виявів мікроангіопатії, уремії і гемолізу без ознак супутніх мутацій в генах комплементу, про які відомо, що вони відповідають за схильність до aHUS. Важливо зазначити, що *S. pneumonia* особливо ефективна в активації комплементу, і здійснює це переважно через лектиновий шлях. Таким чином, у випадках не ентерального HUS, пов'язаного з пневмококовою інфекцією, вияву мікроангіопатії, уремії і гемолізу приблизно зумовлені активацією лектинового шляху, і очікується, що засоби, що блокують лектиновий шлях, включаючи анти-MASP-2 антитіла, будуть запобігати прогресуванню aHUS або зменшувати ступінь тяжкості захворювання у цих пацієнтів. Відповідно, інший аспект даного винаходу стосується лікування пацієнта, який страждає на не ентеральний aHUS, пов'язаний з інфекцією, що викликається *S. pneumonia*, шляхом введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 засобу.

Відповідно до вищевикладеного, в деяких варіантах здійснення у випадку суб'єкта, що має ризик розвитку ниркової недостатності, пов'язаної з aHUS, запропонований спосіб зменшення імовірності розвитку aHUS або розвитку ниркової недостатності, пов'язаної з aHUS, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу в певній кількості протягом періоду часу, ефективного для полегшення або запобігання нирковій недостатності у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає етап визначення того, чи має суб'єкт ризик розвитку aHUS, до початку вияву яких-небудь симптомів, пов'язаних з aHUS. У інших варіантах здійснення спосіб включає визначення того, чи має суб'єкт ризик розвитку aHUS, після початку вияву щонайменше одного або більше симптомів, характерних для aHUS (наприклад, наявності анемії, тромбоцитопенії і/або ниркової недостатності), і/або наявності ознак тромботичної мікроангіопатії в біопсійних зразках, отриманих від суб'єкта. Визначення того, чи має суб'єкт ризик розвитку aHUS, включає визначення того, чи має суб'єкт генетичну схильність до розвитку aHUS, що можна здійснювати шляхом оцінки генетичної інформації (наприклад, в базі даних про генотип суб'єкта), або шляхом проведення щонайменше одного генетичного тесту для суб'єкта з метою визначення наявності або відсутності генетичного маркера, пов'язаного з aHUS (тобто, визначення наявності або відсутності генетичної мутації, пов'язаної з aHUS, в генах, що кодують фактор H (CFH), фактор I (CFI), фактор B (CFB) комплементу, мембранний кофактор CD46, C3, зв'язаний з фактором H комплементу білок 1 (CFHR1), або THBD (антикоагулянтний білок тромбомодулін), або зв'язаний з фактором H комплементу білок 3 (CFHR3), зв'язаний з

фактором Н комплементу білок 4 (CFHR4)), або шляхом секвенування генома, або з використанням специфічного для генів аналізу (наприклад, ПЛР-аналізу), і/або шляхом визначення того, чи має суб'єкт в сімейному анамнезі aHUS. Методи генетичного скринінгу на наявність або відсутність генетичної мутації, пов'язаної з aHUS, добре відомі, наприклад,

5 дивись Noris M et al. "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome", 2007 Nov 16 [допрацьоване 2011 Mar 10] в: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Наприклад, загальна пенетрантність захворювання у суб'єктів з мутаціями фактора Н комплементу (CFH) становить 48 %, і пенетрантність для мутацій в CD46 становить 53 %, для мутацій в CFI становить 50 %, для мутацій в C3 становить 56 % і для мутацій в THBD становить 64 % (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). Як описано в публікації Caprioli et al., (2006), вище, у значного числа індивідуумів з мутацією у факторі Н комплементу (CFH) ніколи не розвивається aHUS, і постульовано, що субоптимальна активність CFH у цих індивідуумів є достатньою для захисту хазяїна від ефектів активації комплементу в фізіологічних умовах, однак субоптимальна активність CFH є недостатньою для запобігання відкладенню C3b на ендотеліальних клітинах судин, коли вплив засобу, що активує комплемент, приводить до утворення кількостей C3b, що перевищують нормальні.

Відповідно, в одному варіанті здійснення запропонований спосіб інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, не залежного від фактора Н атипового гемолітичного уремічного синдрому, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуючий MASP-2 засіб, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У іншому варіанті здійснення запропонований спосіб інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, що має ризик розвитку залежного від фактора Н атипового гемолітичного уремічного синдрому, що включає періодичний моніторинг суб'єкта для визначення наявності або відсутності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну, і лікування інгібуючим MASP-2 засобом при визначенні наявності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну. У іншому варіанті здійснення запропонований спосіб зменшення імовірності того, що суб'єкт, що має ризик розвитку залежного від фактора Н aHUS, буде страждати від клінічних симптомів, пов'язаних з aHUS, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу до, або в процесі, або після події, яка, як відомо, пов'язано з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, наприклад, впливи лікарського засобу (наприклад, хіміотерапії), інфекції (наприклад, бактеріальної інфекції), злоякісного новоутворення, травми, трансплантації органу або тканини, або вагітності.

У одному варіанті здійснення запропонований спосіб зменшення імовірності того, що суб'єкт, що має ризик розвитку aHUS, буде страждати від клінічних симптомів, пов'язаних з aHUS, що включає періодичний моніторинг суб'єкта для визначення наявності або відсутності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну, і лікування інгібуючим MASP-2 засобом при визначенні наявності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну.

У іншому варіанті здійснення запропонований спосіб зменшення імовірності того, що суб'єкт, що має ризик розвитку aHUS, буде страждати від клінічних симптомів, пов'язаних з aHUS, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу до, або в процесі, або після події, яка, як відомо, пов'язано з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, наприклад, впливи лікарського засобу (наприклад, хіміотерапії), інфекції (наприклад, бактеріальної інфекції), злоякісного новоутворення, травми, трансплантації органу або тканини, або вагітності.

У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб вводять протягом періоду часу, що складає щонайменше один, два, три, чотири дні, або довше, до, в процесі, або після події, пов'язаної з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, і введення можна повторювати відповідно до рішення лікаря до того моменту, коли стан буде усунений або взятий під контроль. У умовах пре-aHUS інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення.

У деяких варіантах здійснення у випадку первинного діагностування aHUS, або у випадку суб'єкта, що має один або більше симптомів, які узгоджуються з діагнозом aHUS (наприклад, анемії, тромбоцитопенії і/або ниркової недостатності), суб'єкта лікують ефективною кількістю інгібуючого MASP-2 засобу (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) як терапія першої лінії, без плазмаферезу або в поєднанні з плазмаферезом. Як перша лінія терапії інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб

вводять суб'єкту як терапію першої лінії без плазмаферезу, щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний.

5 У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту, який страждає на aHUS, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів), з подальшим введенням інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протяжністю щонайменше два тижні або довше). У деяких варіантах здійснення
10 введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмаферезу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає визначення рівня щонайменше одного фактора комплементу (наприклад, C3, C5) у суб'єкта до початку лікування і, необов'язково, в процесі лікування, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує
15 на необхідність продовження лікування інгібуючим MASP-2 засобом.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, aHUS, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або, переважно, підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, кожні два тижні. Анти-MASP-2 антитіло
20 можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

HUS

Подібно до атипичного HUS, типова форма HUS має всі клінічні і лабораторні ознаки ТМА. Однак типовий HUS часто є дитячим захворюванням і, як правило, не має сімейного компонента або прямого зв'язку з мутаціями в генах факторів комплементу. Етіологія типового
25 HUS тісно пов'язана з інфекцією, що викликається певними кишковими патогенами. Пацієнти, як правило, мають гостру ниркову недостатність, гемоглобінурію і тромбоцитопенію, яка, як правило, йде за нападом кривавої діареї. Цей стан є наслідком кишкової інфекції, що викликається *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* або продукує токсин, подібний до шига-токсину, ентерогеморагічними штамами *E. coli*, такими як *E. coli* O157:H7. Патогени надходять в організм
30 із забруднених джерел їжі або води. HUS вимагає невідкладної медичної допомоги, і у 5-10 % випадків приводить до смерті. У значної частини тих, що вижили, розвивається хронічна ниркова недостатність (Corrigan and Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11): 365-9 (2011)), і вони можуть потребувати трансплантації нирки.

Мікрovasкулярна коагуляція при типовому HUS відбувається переважно, але не виключно, в мікросудинному руслі нирки. Основні патофізіологічні ознаки опосередковуються шига-токсинам (STX). STX, що виділяється ентеропатичними мікробами в просвіт кишечника, проникає через
35 кишковий бар'єр, потрапляє в кровоток і зв'язується з ендотеліальними клітинами судин через блоботриаозил-церамідний рецептор CD77 (Boyd and Lingwood *Nephron* 51:207 (1989)), який переважно експресується на ендотелії клубочків і опосередковує токсичний ефект STX. Після зв'язування з ендотелієм STX індукує серію подій, які ушкоджують ендотелій судин, активують
40 лейкоцити і спричиняють vWF-залежне утворення тромбів (Forsyth et al., *Lancet* 2: 411-414 (1989); Zoja et al., *Kidney Int.* 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., *J. Immunol.* 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., *Blood* 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., *Infect. Immun.*, 73: 8306-8316 (2005)). Ці мікротромби закупорюють або перекривають артеріоли і капіляри нирки і інших органів.
45 Обструкція кровотоку в артеріолах і капілярах мікротромбами збільшує силу зсуву, яка діє на еритроцити при їх просуванні через звужені кровоносні судини. Це може приводити до руйнування еритроцитів за рахунок сили зсуву і утворення фрагментів еритроцитів, які називаються шизоцитами. Наявність шизоцитів є характерною ознакою HUS. Даний механізм відомий як мікроангіопатичний гемоліз. Крім того, обструкція кровотоку приводить до ішемії,
50 ініціюючи опосередковану комплементом запальну відповідь, що викликає додаткове пошкодження ураженого органу.

Лектиновий шлях комплементу бере участь в патогенезі HUS за рахунок двох основних механізмів: 1) MASP-2-опосередкованої прямої активації каскаду коагуляції, що викликається пошкодженням ендотелію, і 2) подальшої лектин-опосередкованої активації комплементу, що
55 індукується ішемією, яка виникає внаслідок початкової оклюзії мікросудинного кровотоку.

STX ушкоджує мікрovasкулярні ендотеліальні клітини, і пошкоджені ендотеліальні клітини, як відомо, активують систему комплементу. Як детально описано вище, активація комплементу після пошкодження ендотеліальних клітин здійснюється переважно через лектиновий шлях. Людські ендотеліальні клітини судин, піддані окиснювальному стресу, відповідають експресією
60 поверхневих молекул, які зв'язують лектини і активують лектиновий шлях комплементу (Collard

et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56 (2000)). Пошкодження судин після ішемії/реперфузії також приводить до активації комплементу через лектиновий шлях *in vivo* (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). Активація лектинового шляху в цих умовах має патологічні наслідки для хазяїна, і інгібування лектинового шляху за рахунок блокування MASP-2 запобігає подальшому пошкодженню тканин хазяїна і несприятливим результатам (Schwaeble PNAS 2011). Крім активації комплементу, лектин-залежна активація MASP-2, як показано, приводить до розщеплення протромбіну, з утворенням тромбіну, і стимулює коагуляцію. Таким чином, активація лектинового шляху комплементу пошкодженими ендотеліальними клітинами може напряму активувати систему коагуляції. Лектиновий шлях комплементу, за рахунок MASP-2-опосередкованої активації протромбіну, таким чином, ймовірно, є основним молекулярним шляхом, який зв'язує первинне пошкодження STX ендотелію з коагуляцією і мікросудинним тромбозом, який відбувається при HUS. Внаслідок цього очікується, що інгібітори лектинового шляху, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть запобігати або зменшувати мікросудинну коагуляцію, тромбоз і гемоліз у пацієнтів, які страждають на HUS. Дійсно, введення анти-MASP-2 антитіла ефективно захищає мишей в моделі типового HUS. Як описано в прикладі 36 і показано на ФІГУРІ 45, у всіх контрольних мишей, підданих впливу STX і LPS, розвивався важкий HUS, вони знаходилися в передсмертному стані або гинули протягом 48 годин. З іншого боку, як додатково показано на ФІГУРІ 45, всі миші, що отримували анти-MASP-2 антитіло, а потім піддані впливу STX і LPS, виживали (точний критерій Фішера $p < 0,01$; $N=5$). Таким чином, анти-MASP-2 терапія ефективно захищає мишей в даній моделі HUS. Очікується, що введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, буде ефективно для лікування пацієнтів з HUS і забезпечить захист від мікросудинної коагуляції, тромбозу і гемолізу внаслідок інфекції, що викликається ентеропатичною *E. coli* або іншими STX-продукуючими патогенами.

Хоча в цьому документі це продемонстровано для HUS, що викликається STX, очікується, що анти-MASP-2 терапія також буде корисною при HUS-подібних синдромах внаслідок пошкодження ендотелію, що викликається іншими токсичними засобами. До них належать такі засоби, як мітоміцин, тиклопідин, цисплатин, хінін, циклоспорин, блеоміцин, а також інші хіміотерапевтичні лікарські засоби і імунодепресанти. Таким чином, очікується, що терапія анти-MASP-2 антитілом, або іншими засобами, якими інгібують активність MASP-2, буде ефективно запобігати або обмежувати коагуляцію, утворення тромбів і руйнування еритроцитів, а також запобігати нирковій недостатності при HUS і інших пов'язаних захворюваннях TMA (тобто, aHUS і ТТП).

У пацієнтів, які страждають на HUS, часто спостерігається діарея і блювання, у них, як правило, знижена кількість тромбоцитів (тромбоцитопенія) і знижено кількість еритроцитів (анемія). Пре-HUS фаза діареї, як правило, продовжується протягом приблизно чотирьох днів, в цей період суб'єкти, що мають ризик розвитку HUS, як правило, мають один або більше з наступних симптомів, крім тяжкої діареї: рівень гематокриту нижче 30 % з ознаками внутрішньосудинного руйнування еритроцитів в мазку крові, тромбоцитопенія (кількість тромбоцитів $< 150 \times 10^3/\text{мм}^3$), і/або порушення ниркової функції (сироваткова концентрація креатиніну вище верхньої межі еталонного діапазону для віку). Наявність олігурії (діурез $\leq 0,5$ мл/кг/год. протягом > 1 дня) може бути використана як міра прогресування у бік розвитку HUS (дивись С. Hickey et al., Arch Pediatr Adolesc Med 165(10):884-889 (2011)). Як правило, проводять тестування на наявність інфекції, що викликається бактеріями *E. coli* (*E. coli* O157:H7), або видами *Shigella* або *Salmonella*. Для суб'єктів з позитивними результатами тесту на інфекцію, що викликається ентерогенною *E. coli* (наприклад, *E. coli* O157:H7), використання антибіотиків протипоказане, оскільки використання антибіотиків може підвищувати ризик розвитку HUS за рахунок підвищеного продукування STX (Дивись Wong C. et al., N Engl J. Med 342:1930-1936 (2000)). Суб'єктам з позитивними результатами тесту на інфекцію, що викликається *Shigella* або *Salmonella*, як правило, вводять антибіотики для усунення інфекції. Інша терапія першої лінії, що широко використовується проти HUS, включає збільшення об'єму крові, діалізу і плазмаферез.

Відповідно до вищевикладеного, в деяких варіантах здійснення у випадку суб'єкта, який страждає на один або більше симптомів, пов'язаних з фазою пре-HUS, і має ризик розвитку HUS (тобто, суб'єкта, що має одне або більше з наступного: діарея, рівень гематокриту нижче 30 % з ознаками внутрішньосудинного руйнування еритроцитів в мазку крові, тромбоцитопенія (кількість тромбоцитів $< 150 \times 10^3/\text{мм}^3$) і/або порушення ниркової функції (сироваткова концентрація креатиніну вище верхньої межі еталонного діапазону для віку)), запропонований спосіб зменшення ризику розвитку HUS, або зменшення імовірності розвитку ниркової недостатності у суб'єкта, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу в певній кількості

протягом періоду часу, ефективного для полегшення або запобігання нирковій недостатності. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб вводять протягом періоду часу, що складає щонайменше один, два, три, чотири дні, або довше, і введення можна повторювати відповідно до рішення лікаря до того моменту, коли стан буде усунений або взятий під контроль. У випадку пре-HUS інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгалаційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення.

Лікування інфекції, що викликається *E. coli* 0157:H7, бактерицидними антибіотиками, зокрема, β -лактамами, пов'язане з підвищеним ризиком розвитку HUS (Smith et al., *Pediatr Infect Dis J* 31(1):37-41 (2012)). В деяких варіантах здійснення у випадку суб'єкта, який страждає на симптоми, пов'язані з фазою пре-HUS, який, як відомо має інфекцію, що викликається ентерогенною *E. coli*, при якій використання антибіотиків протипоказане (наприклад, *E. coli* 0157:H7), запропонований спосіб зменшення ризику розвитку HUS, або зменшення імовірності розвитку ниркової недостатності у суб'єкта, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу в певній кількості протягом першого періоду часу, ефективного для інгібування або запобігання олігурії у суб'єкта (наприклад, протягом щонайменше одного, двох, трьох або чотирьох днів), при цьому введення інгібуючого MASP-2 засобу протягом першого періоду часу виконують без використання антибіотика. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту в поєднанні з антибіотиком протягом другого періоду часу (наприклад, щонайменше одних-двох тижнів).

У інших варіантах здійснення у випадку суб'єкта, який страждає на симптоми, пов'язані з фазою пре-HUS, який, як відомо має інфекцію, що викликається *Shigella* або *Salmonella*, запропонований спосіб зменшення ризику розвитку HUS, або зменшення імовірності розвитку ниркової недостатності у суб'єкта, що включає введення інгібуючого MASP-2 засобу в певній кількості протягом періоду часу, ефективного для інгібування або запобігання олігурії у суб'єкта, при цьому введення інгібуючого MASP-2 засобу виконують або з використанням, або без використання, відповідного антибіотика.

У деяких варіантах здійснення у випадку первинного діагностування aHUS, або у випадку суб'єкта, що має один або більше симптомів, які узгоджуються з діагнозом aHUS (наприклад, ниркову недостатність або мікроангіопатичну гемолітичну анемію без низького рівня фібриногену, або тромбоцитопенію), суб'єкту вводять ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) як терапія першої лінії без плазмаферезу або в поєднанні з плазмаферезом. Як перша лінія терапії інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгалаційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту як терапію першої лінії без плазмаферезу, щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту, який страждає на HUS, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, гострої фази, що продовжується протягом щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів), з подальшим введенням інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази, що продовжується протягом щонайменше двох тижнів, або довше). У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмаферезу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає визначення рівня щонайменше одного фактора комплементу (наприклад, C3, C5) у суб'єкта до початку лікування і, необов'язково, в процесі лікування, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує на необхідність лікування, і при цьому визначення нормального рівня вказує на поліпшення стану.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, HUS, підшкірно або внутрішньовенно. Переважно, введення виконують щодня, але можна виконувати не частіше, ніж щотижня або щомісяця. Лікування буде продовжуватися протягом щонайменше одного тижня і аж до 3 місяців. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

ТТП:

Тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП) являє собою небезпечне для життя

захворювання системи згортання крові, що викликається аутоімунними або спадковими дисфункціями, які активують каскад коагуляції або систему комплементу (George, JN, N Engl J Med; 354:1927-35 (2006)). Це приводить до утворення численних мікроскопічних згустків, або тромбозу, в дрібних кровоносних судинах у всьому тілі. На еритроцити діє сила зсуву, яка ушкоджує їх мембрани, що приводить до внутрішньосудинного гемолізу. У результаті зниження кровотоку і ендотеліальні пошкодження приводять до пошкодження органів, включаючи мозок, серце і нирки. ТТП клінічно характеризується наявністю тромбоцитопенії, мікроангіопатичної гемолітичної анемії, неврологічних змін, ниркової недостатності і пропасниці. У епоху до застосування плазмаферезу смертність становила 90 % під час гострих нападів. Навіть при використанні плазмаферезу виживаність через шість місяців становить приблизно 80 %.

ТТП може розвиватися внаслідок генетичного або набутого інгібування ферменту ADAMTS-13, металопротеїнази, відповідальної за розщеплення великих мультимерів фактора фон Віллебранда (vWF) на більш дрібні одиниці. Інгібування або дефіцит ADAMTS-13 в результаті приводить до підвищеної коагуляції (Tsai, H. J Am Soc Nephrol 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13 регулює активність vWF; в його відсутність vWF утворить великі мультимери, які частіше зв'язують тромбоцити і створюють у пацієнтів схильність до агрегації тромбоцитів і тромбозу в мікросудинному руслі.

Синдром Апшо-Шульмана (USS, який також називається вродженою ТТП) являє собою спадкову недостатність активності ADAMTS-13 внаслідок мутацій в гені ADAMTS-13 (Schulman et al., Blood, 16(1):943-57, 1960; Upshaw et al., New Engl. J. Med, 298 (24):1350-2, 1978). Численні мутації в гені ADAMTS-13 були ідентифіковані у індивідумів з вродженою ТТП (Kinoshita et al., International Journal of Hematology, 74:101-108 (2001); Levy et al., Nature, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., Blood, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., Blood, 103:1305-1310 (2004) і Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754 (2008)). У суб'єктів з USS, як правило, активність ADAMTS-13 становить 5-10 % від нормальної (Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907, 2002). Хоча набута ТТП і USS мають деяку схожість, USS має деякі важливі відмінності в клінічних ознаках. USS, як правило, виявляється в дитячому або дитячому віці і характеризується важкої гіпербілірубінемією, з негативними результатами тесту Кумбса, незабаром після народження, реакцією на інфузію свіжої плазми і частими рецидивами (Savasan et al., Blood, 101:4449-4451, 2003). У деяких випадках пацієнти зі спадковим дефіцитом ADAMTS-13 мають слабкий фенотипічний вияв при народженні, і у них симптоми, пов'язані з ТТП, виявляються лише в клінічних ситуаціях, при яких підвищуються рівні фактора фон Віллебранда, таких як інфекція або вагітність. Наприклад, Fujimura зі співавторами повідомляли про 9 японських жінок з 6 сімей з генетично підтвердженим USS, у яких захворювання було діагностоване під час їх першої вагітності. Тромбоцитопенія, яка виникає протягом другого-третього триместра в кожній з їх 15 вагітностей, часто супроводжувалася ТТП. У кожної з цих жінок була виявлена тяжка недостатність активності ADAMTS-13 (Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754, 2008).

Відповідно до вищевикладеного, в деяких варіантах здійснення у випадку суб'єкта з синдромом Апшо-Шульмана (USS) (тобто, суб'єкта, який, як відомо, має недостатність активності ADAMTS-13, і/або суб'єкта, який, як відомо, має одну або більше мутацій в гені ADAMTS-13), запропонований спосіб зменшення імовірності розвитку клінічних симптомів, пов'язаних з вродженою ТТП (наприклад, тромбоцитопенії, анемії, пропасниці і/або ниркової недостатності), що включає введення певної кількості інгібуючого MASP-2 засобу (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) протягом періоду часу, ефективною для полегшення або запобігання одному або більше клінічних симптомів, пов'язаних з ТТП. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає етап визначення того, чи має суб'єкт ризик розвитку симптомів, пов'язаних з вродженою ТТП, до початку розвитку яких-небудь симптомів, пов'язаних з ТТП, або після початку розвитку щонайменше одного або більше симптомів, характерних для ТТП (наприклад, анемії, тромбоцитопенії і/або ниркової недостатності). Визначення того, чи має суб'єкт ризик розвитку симптомів, пов'язаних з вродженою ТТП (тобто, суб'єкт має USS), включає визначення того, чи має суб'єкт мутацію в гені, що кодує ADAMTS-13, і/або визначення того, чи має суб'єкт недостатність активності ADAMTS-13, і/або визначення того, чи має суб'єкт USS в сімейному анамнезі. Способи генетичного скринінгу на наявність або відсутність генетичної мутації, пов'язаної з USS, добре відомі, наприклад, дивись Kinoshita et al., International Journal of Hematology, 74:101-108 (2001); Levy et al., Nature, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., Blood, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., Blood, 103:1305-1310 (2004) і Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754 (2008).

У одному варіанті здійснення запропонований спосіб зменшення імовірності того, що суб'єкт, що має діагностований USS, буде страждати від клінічних симптомів, пов'язаних з ТТП, що

включає періодичний моніторинг суб'єкта для визначення наявності або відсутності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну, і лікування інгібуючим MASP-2 засобом (наприклад, анти-MASP-2 антитілом) при визначенні наявності анемії, тромбоцитопенії або підвищеного рівня креатиніну, або при наявності події, яке, як відомо, пов'язано з ініціюванням клінічних симптомів ТТП, наприклад, впливи лікарського засобу (наприклад, хіміотерапії), інфекції (наприклад, бактеріальної інфекції), злоякісного новоутворення, травми, трансплантації або вагітності.

У іншому варіанті здійснення запропонований спосіб лікування суб'єкта з USS, який страждає на клінічні симптоми, пов'язані з ТТП, що включає введення певної кількості інгібуючого MASP-2 засобу (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) протягом періоду часу, ефективною для полегшення або запобігання одному або більш клінічних симптомів, пов'язаного з ТТП.

ТТП також може розвиватися внаслідок наявності аутоантитіл проти ADAMTS-13. Крім того, ТТП може розвиватися на фоні раку молочної залози, шлунково-кишкового тракту або передміхурової залози (George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14 (2011)), вагітності (другий триместр або після родів), George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344 (2003)), або в зв'язку з такими захворюваннями, як ВІЛ або аутоімунні захворювання, такі як системна червона вовчак (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol*. 22:355-8 (2003)). ТТП також може бути викликана деякими терапевтичними засобами, включаючи гепарин, хінін, імуно-опосередкований інгредієнт, протиракові хіміотерапевтичні засоби (блеоміцин, цисплатин, цитозин арабінозид, дауноміцин гемцитабін, мітоміцин С і тамоксифен), циклоспорин А, пероральні контрацептиви, пеніцилін, рифампін і протитромбозні лікарські засоби, включаючи тиклопідин і клопідогрел (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci*, 16: 353-357 (2011)). Іншими чинниками або умовами, пов'язаними з ТТП, є токсини, такі як бджолина отрута, сепсис, секвестрація селезінки, трансплантація, васкуліт, хірургічна операція на судинах і інфекції, такі як пневмонія, що викликається *Streptococcus*, і інфекція, що викликається цитомегаловірусом (Moake JL., *N Engl J Med*, 347:589-600 (2002)). ТТП внаслідок тимчасової функціональної недостатності ADAMTS-13 може розвиватися як наслідок пошкодження ендотеліальних клітин, пов'язаного з інфекцією, що викликається *S. pneumonia* (*Pediatr Nephrol*., 26:631-5 (2011)).

Плазмаферез є стандартним методом лікування ТТП (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397 (1991)). Плазмаферез дозволяє поповнювати нестачу активності ADAMTS-13 у пацієнтів з генетичними дефектами і видаляти аутоантитіла до ADAMTS-13 у пацієнтів з набутою аутоімунною ТТП (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am*., 21(4): 609-v (2007)). У лікуванні звичайно використовують додаткові засоби, такі як імунодепресанти (George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35 (2006)). Однак плазмаферез не є успішним для приблизно 20 % пацієнтів, у більше ніж третини пацієнтів виникає рецидив, і плазмаферез також є і технічно складною процедурою, що дорого коштує. Більше того, багато пацієнтів не здатні переносити плазмаферез. Отже, зберігається гостра потреба в додаткових, більш ефективних методах лікування ТТП.

Оскільки ТТП є порушенням каскаду згортання крові, лікування антагоністами системи комплементу може сприяти стабілізації і ослабленню захворювання. При тому, що патологічна активація альтернативного шляху комплементу пов'язана з aHUS, роль активації комплементу при ТТП менш зрозуміла. Функціональна недостатність ADAMTS-13 є важливою для схильності до ТТП, однак її недостатньо для викликання гострих нападів. Екологічні чинники і/або інші генетичні варіації можуть вносити внесок у вияв ТТП. Наприклад, гени, що кодують білки, що беруть участь в регуляції каскаду коагуляції, vWF, функції тромбоцитів, компонентів ендотелію поверхні судин або системи комплементу, можуть вносити свій внесок в розвиток гострої тромботичної мікроангіопатії (Galbusera, M. et al., *Haematologica*, 94: 166-170 (2009)). Зокрема, показано, що дуже важливу роль грає активація комплементу; відомо, що сироватка суб'єктів з тромботичною мікроангіопатією, пов'язаною з недостатністю ADAMTS-13, викликає відкладення C3 і MAC, і подальшу активацію нейтрофілів, що може бути відмінено шляхом інактивації комплементу (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52 (2005)). Крім того, нещодавно було показано, що під час гострих нападів ТТП мають місце підвищені рівні C4d, C3bBbP і C3a (M. Reti et al., *J Thromb Haemost*. Feb 28.(2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674 x. [електронна публікація до виходу в друк]), що узгоджується з активацією класичного/лектинового і альтернативного шляхів. Цей підвищений ступінь активації комплементу при гострих епізодах може ініціювати активацію термінального шляху і бути причиною подальших ускладнень ТТП.

Роль ADAMTS-13 і vWF при ТТП, безсумнівно, полягає в активації і агрегації тромбоцитів і їх подальшій участі в створенні сили зсуву і відкладення при мікроангіопатіях. Активовані тромбоцити взаємодіють і запускають як класичний, так і альтернативний, шляхи комплементу.

Опосередкована тромбоцитами активація комплементу приводить до підвищення рівня запальних медіаторів C3a і C5a (Peerschke E et al., Mol Immunol, 47:2170-5 (2010)). Таким чином, тромбоцити можуть служити як мішені при класичній активації комплементу у випадку спадкової або аутоімунної ТТП.

Як описано вище, лектиновий шлях комплементу, внаслідок опосередкованої MASP-2 активації протромбіну, є основним молекулярним шляхом, який зв'язує пошкодження ендотелію з коагуляцією і тромбозом мікросудин, що відбувається при HUS. Аналогічно, активація лектинового шляху комплементу може безпосередньо керувати системою коагуляції при ТТП. Активация лектинового шляху може запускатися у відповідь на початкове пошкодження ендотелію, що викликається недостатністю ADAMTS-13 при ТТП. Внаслідок цього очікується, що інгібітори лектинового шляху, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть полегшувати мікроангіопатії, пов'язані з мікросудинною коагуляцією, тромбозом і гемолізом, у пацієнтів, які страждають на ТТП.

Пацієнти, які страждають на ТТП, як правило, приймаються у відділення невідкладної допомоги з одним або більше з наступного: пурпура, ниркова недостатність, низький рівень тромбоцитів, анемія і/або тромбоз, включаючи інсульт. Сучасний стандарт надання медичною допомогою при ТТП включає проведення через катетер (наприклад, внутрішньовенний або інший катетер) замісного плазмаферезу протягом двох тижнів, або довше, як правило, трьох разів на тиждень, аж до щоденної процедури. Якщо суб'єкт має позитивні результати тесту на наявність інгібітора ADAMTS-13 (тобто, ендегенне антитіло проти ADAMTS-13), тоді плазмаферез можна проводити в поєднанні з імунодепресантами (наприклад, кортикостероїдами, ритуксаном або циклоспорином). Суб'єкти з рефрактерно ТТП (приблизно 20 % пацієнтів з ТТП) не відповідають на продовжувану протягом щонайменше двох тижнів терапію з використанням плазмаферезу.

Відповідно до вищевикладеного, в деяких варіантах здійснення у випадку первинного діагностування ТТП, або у випадку суб'єкта, що має один або більше симптомів, які узгоджуються з діагнозом ТТП (наприклад, ураження центральної нервової системи, тяжку тромбоцитопенію (кількість тромбоцитів, яка менша або дорівнює 5000/мкл без аспіріну, менша або дорівнює 20000/мкл при прийомі аспіріну), тяжке ураження серця, тяжке ураження легень, інфаркт кишечника або гангрена), запропонований спосіб лікування суб'єкта ефективною кількістю інгібуючого MASP-2 засобу (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) як першої лінії терапії без плазмаферезу або в поєднанні з плазмаферезом. Як першу лінію терапії інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту як терапію першої лінії без плазмаферезу, щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який страждає на ТТП, в поєднанні (включаючи спільне введення) з імунодепресантом (наприклад, кортикостероїдами, ритуксаном або циклоспорином) і/або в поєднанні з концентрованим ADAMTS-13.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту, який страждає на ТТП, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, гострої фази, що продовжується протягом щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів), з подальшим введенням інгібуючого MASP-2 засобу суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази, що продовжується протягом щонайменше двох тижнів, або довше). У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмаферезу. У деяких варіантах здійснення спосіб використовують як підтримувальну терапію для запобігання страждань суб'єкта від одного або більше симптомів, пов'язаних з ТТП.

У іншому варіанті здійснення запропонований спосіб лікування суб'єкта, який страждає на рефрактерну ТТП (тобто, суб'єкта, який не відповідав на проведення плазмаферезу протягом щонайменше двох тижнів), шляхом введення інгібітора MASP-2 в кількості, ефективній для зменшення одного або більше симптомів ТТП. У одному варіанті здійснення інгібітор MASP-2 (наприклад, анти-MASP-2 антитіло) вводять суб'єкту з рефрактерною ТТП на постійній основі протягом періоду часу, що становить щонайменше два тижні, або довше, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення. Введення можна повторювати відповідно до рішення лікаря до того моменту, коли стан буде усунений або взятий під контроль.

У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає визначення рівня щонайменше

одного фактора комплементу (наприклад, C3, C5) у суб'єкта до початку лікування і, необов'язково, в процесі лікування, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування інгібуючим MASP-2 засобом.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТТП, підшкірно або внутрішньовенно. Переважно, введення виконують щодня, але можна виконувати не частіше, ніж раз на два тижні. Введення продовжують доти, коли кількість тромбоцитів у суб'єкта досягає рівня, що перевищує 150000/мл, протягом щонайменше двох послідовних днів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на ТТП, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 %, порівняно з контрольною сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на ТТП, на рівні, щонайменше на 20 відсотків або більше (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %), що перевищує інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта з ТТП на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на ТТП, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою).

щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способів включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення способів включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способів включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Хвороба Дегоса

Хвороба Дегоса, також відома як злоякісний атрофічний папулез, є дуже рідкісним видом ТМА, при якому вражаються дрібні судини шкіри, шлунково-кишкового тракту і ЦНС. Ця васкулопатія викликає оклюзію венул і артеріол, що приводить до уражень шкіри, кишкової ішемії і порушенням ЦНС, включаючи інсульт, епілепсію і когнітивні порушення. У шкірі розвивається некроз сполучної тканини внаслідок тромботичної оклюзії дрібних артерій. Однак причина хвороби Дегоса невідома. Передбачають участь васкуліта, коагулопатії або первинної дисфункції ендотеліальних клітин. Рівень виживаності при хворобі Дегоса становить 50 % протягом всього лише від двох до трьох років. Ефективне лікування для хвороби Дегоса відсутнє, хоча використовують антитромбоцитарні лікарські засоби, антикоагулянти і імунодепресанти для полегшення симптомів.

Хоча механізм хвороби Дегоса невідомий, передбачають участь шляху комплементу. Margo зі співавторами виявили виражене відкладення C5b-9 в судинах шкіри, шлунково-кишкового тракту і мозку у чотирьох пацієнтів, що померли з хворобою Дегоса (Margo et al., Am J Clin Pathol 135(4):599-610, 2011). Експериментальне лікування екулізумабом початково було ефективним для лікування шкірних і кишкових лезій, але не запобігало прогресуванню системного захворювання (дивись Garrett-Bakelman F. et al., "C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab" (Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster №156; i Polito J. et al., "Early detection of systemic Degos disease (DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival" (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster №1205).

Багато пацієнтів, які страждають на хворобу Дегоса, мають порушення згортання крові. Тромботична оклюзія дрібних артерій в шкірі є характерною ознакою захворювання. Оскільки в це захворювання залучений шлях комплементу, як описано в цьому документі для інших ТМА, очікується, що інгібітори лектинового шляху, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть корисні в лікуванні пацієнтів, які страждають на хворобу Дегоса.

Відповідно, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способів лікування хвороби Дегоса шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на хворобу Дегоса, або стану, пов'язаного з хворобою Дегоса. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який страждає на хворобу Дегоса, або стану, пов'язаного з хворобою Дегоса, системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більше з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане

антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплекменту).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, на рівні, щонайменше на 20 відсотків або більш (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %) перевищуючому інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта з хворобою Дегоса на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Катастрофічний антифосфоліпідний синдром (CAPS)

Катастрофічний антифосфоліпідний синдром (CAPS) являє собою екстремальний варіант синдрому антифосфоліпідних антитіл (APLA). CAPS характеризується венозним і артеріальним тромбозом внаслідок патогенних антитіл. CAPS являє собою TMA з тромбозом, ішемією декількох органів і поліорганною недостатністю. Як і в інших TMA, характерною особливістю є оклюзія дрібних судин в різних органах. CAPS має високий рівень смертності, що становить приблизно 50 %, і часто пов'язаний з інфекцією або травмою. Пацієнти мають антифосфоліпідні

антитіла, як правило, IgG.

Клінічні ознаки CAPS включають наявність щонайменше трьох органів або тканин з гістопатологічним свідченням оклюзії дрібних судин. Периферичний тромбоз може торкатися вен і артерій в ЦНС, серцево-судинній, нирковій або легеневій системах. Пацієнти отримують антибіотики, антикоагулянти, кортикостероїди, плазмаферез і внутрішньовенний імунглобулін. Проте, поліорганна недостатність може приводити до смерті.

Передбачають участь шляху комплементу в CAPS. Наприклад, дослідження на тваринних моделях показують, що інгібування комплементу може бути ефективним способом запобігання тромбозу, пов'язаному з CAPS (Shapira L. et al., *Arthritis Rheum* 64(8):2719-23, 2012). Більше того, як також повідомляли Shapira зі співавторами, введення екулізумабу суб'єкту, який страждає на CAPS, в дозах, що приводять до блокування шляху комплементу, усувало гострі прогресуючі тромботичні явища і повертало назад тромбоцитопенію (дивись також Lim W., *Curr Opin Hematol* 18(5):361-5, 2011). Таким чином, як описано в цьому документі для інших TMA, очікується, що інгібітори лектинового шляху, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть корисні в лікуванні пацієнтів, які страждають на CAPS.

Відповідно, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способів лікування CAPS шляхом введення композиції, яка містить терапевтичну ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на CAPS, або стану, пов'язаного з CAPS. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який страждає на CAPS, або стану, пов'язаного з CAPS, системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на CAPS, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на CAPS, на рівні, щонайменше на 20 відсотків або більш (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %) перевищуючому інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта з CAPS на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на CAPS, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що

містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що

5 містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше

10 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

15 У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що

20 містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом

25 OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 i варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

ТМА в результаті раку

Системні злоякісні новоутворення різного виду можуть приводити до клінічних і патологічних виявів ТМА (дивись, наприклад, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719,

30 2007). Пов'язана з раком ТМА часто буває виявлена в легенях і, судячи з усього, пов'язана з пухлинними емболами (Francis KK et al., Commun Oncol 2:339-43, 2005). Пухлинні емболи можуть зменшувати тік крові і, таким чином, приводити до гіперфузійного стану в уражених артеріолах і венулах. Виникаючі внаслідок цього стрес і пошкодження тканин, ймовірно, локалізованим чином активують лектиновий шлях комплементу. Активований лектиновий шлях,

35 в свою чергу, може активувати каскад коагуляції через MASP-2-залежне розщеплення протромбіну до тромбіну, приводячи до протромботичного стану, характерного для ТМА. Очікується, що інгібування MASP-2 в цьому випадку буде зменшувати локалізовану активацію тромбіну і, таким чином, полегшувати протромботичний стан.

Таким чином, як описано в цьому документі для інших ТМА, очікується, що інгібітори лектинового шляху, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2,

40 будуть корисні в лікуванні пацієнтів, які страждають на ТМА в результаті раку.

Відповідно, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способів лікування або запобігання ТМА в результаті раку шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, в

45 фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТМА в результаті раку. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТМА в результаті раку, системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

50

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане

55 антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою

60 молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане

антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплекменту).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на ТМА в результаті раку, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта, який страждає на ТМА в результаті раку, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на ТМА в результаті раку, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

ТМА внаслідок протиракової хіміотерапії

Пов'язана з хіміотерапією ТМА являє собою стан, що включає тромбоцитопенію, мікроангіопатичну гемолітичну анемію і ниркову дисфункцію, який розвивається у 2-10 % пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями в анамнезі, що отримували хіміотерапевтичні засоби, такі як гемцитабін, мітоміцин, оксалиплатин і інші. Пов'язана з хіміотерапією ТМА характеризується несприятливими клінічними результатами з високим рівнем смертності (дивись, наприклад, Blake-Haskins et al., Clin Cancer Res 17(18):5858-5866, 2011).

Вважають, що етіологія ТМА внаслідок хіміотерапії пов'язана з неспецифічним токсичним пошкодженням мікровазкулярного ендотелію. Безпосереднє пошкодження ендотеліальних

клітин було продемонстроване в тваринній моделі індукованої мітоміцином TMA (Dlott J. et al., Ther Apher Dial 8:102-11, 2004). Показано, що пошкодження ендотеліальних клітин за рахунок різних механізмів приводить до активації лектинового шляхи комплементу. Наприклад, Stahl з співавторами показали, що ендотеліальні клітини, піддані окиснювальному стресу, активують лектиновий шлях комплементу як *in vitro*, так і *in vivo* (Collard et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56, 2000; La Bonte et al., J Immunol. 15:188(2):885-91, 2012). *In vivo* цей процес приводить до тромбозу, і показано, що інгібування лектинового шляху запобігає тромбозу (La Bonte et al. J Immunol. 15:188(2):885-91, 2012). Крім того, як продемонстровано в прикладах 37-39 в цьому документі, в мишачій моделі TMA, в якій локалізоване збудження фотонами FITC-Dex було використане для індукції локалізованого пошкодження мікросудинного русла, з подальшим розвитком відповіді у вигляді TMA, автори даного винаходу показали, що інгібування MASP-2 може запобігати TMA. Таким чином, пошкодження мікрovasкулярного ендотелію хіміотерапевтичними засобами може активувати лектиновий шлях комплементу, який потім створює локалізований протромботичний стан і стимулює відповідь у вигляді TMA. Оскільки активація лектинового шляху і створення протромботичного стану залежить від MASP-2, очікується, що інгібітори MASP-2, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть приводити до зменшення відповіді у вигляді TMA і зменшення ризику розвитку пов'язаною з протираковою хіміотерапією TMA.

Відповідно, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способів лікування або запобігання TMA внаслідок хіміотерапії шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, TMA внаслідок хіміотерапії. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який отримувач, отримує або буде отримувати хіміотерапію, системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на TMA внаслідок хіміотерапії, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта, який страждає на TMA внаслідок протиракової хіміотерапії, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на TMA внаслідок протиракової хіміотерапії, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його

антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способу включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення способу включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способу включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 i варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

ТМА внаслідок трансплантації

Пов'язана з трансплантацією ТМА (ТА-ТМА) являє собою руйнівний синдром, який може розвиватися у трансплантат пацієнтів, що отримали, наприклад, реципієнтів трансплантата алогенних гемопоетичних стовбурових клітин (дивись, наприклад, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007). Патогенез цього стану не до кінця зрозумілий, однак ймовірно, включає сукупність відповідей, які приводять до пошкодження ендотеліальних клітин (Laskin B.L. et al., Blood 118(6):1452-62, 2011). Як описано вище, пошкодження ендотеліальних клітин є типовим стимулом для активації лектинового шляху i створення протромботичного стану.

Останні дані додатково свідчать на користь активації комплементу через лектиновий шлях в патогенезі ТА-ТМА. Laskin з співавторами продемонстрували, що відкладення C4d в артеріолах нирок частіше зустрічалось у суб'єктів з гістологічними ознаками ТА-ТМА (75 %), порівняно з контрольними суб'єктами (8 %) (Laskin B.L., et al., Transplantation, 27; 96(2):217-23, 2013). Таким чином, C4d може бути патологічним маркером ТА-ТМА, що стосується локалізованої фіксації комплементу через лектиновий або класичний шлях.

Оскільки активація лектинового шляху i створення протромботичного стану залежить від MASP-2, очікується, що інгібітори MASP-2, включаючи, але без обмеження, антитіла, що блокують функцію MASP-2, будуть приводити до зменшення відповіді у вигляді ТМА i зменшення ризику розвитку пов'язаної з трансплантатом ТМА (ТА-ТМА).

Відповідно, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способів лікування або запобігання ТМА внаслідок трансплантації шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як анти-MASP-2 антитіло, в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТМА внаслідок трансплантації. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту, який зазнавав, зазнає, або буде зазнавати процедури трансплантації, системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним, назальним, підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Анти-MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб. У деяких варіантах здійснення винахід стосується способів лікування або запобігання ТМА внаслідок трансплантації алогенних стовбурових клітин, що включають введення композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло, суб'єкту до, в процесі, або після отримання трансплантата

алогенних стовбурових клітин.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P, і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на TMA внаслідок трансплантації, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці пацієнта, який страждає на TMA внаслідок трансплантації, на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 % наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 % аж до 99 % порівняно з контрольною сироваткою.

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на TMA внаслідок трансплантації, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 i варіабельну

ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

IV. Роль MASP-2 в інших захворюваннях і станах, і способи лікування з використанням інгібуючих MASP-2 засобів

Захворювання нирок

- 5 Активація системи комплементу бере участь в патогенезі різних захворювань нирок; включаючи мезангіопроліферативний гломерулонефрит (IgA-нефропатія, хвороба Бергера) (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001), мембранозний гломерулонефрит (Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., Kidney Int., 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., Kidney Int. 35:976-84, 1989), мембранозно-проліферативний гломерулонефрит (мезангіокапиллярний гломерулонефрит) (Bartlow, B.G., et al., Kidney Int. 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., J. Exp. Med. 175:939-50, 1992), гострий постінфекційний гломерулонефрит (постстрептококовий гломерулонефрит), криоглобулінемічний гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol. 101:59-66, 2001), вовчаковий нефрит (Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6, 1991) і нефрит на фоні пурпури Геноха-Шенлейна (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 15 2000). Залучення комплементу до ниркової недостатності визнавалося протягом декількох десятиріч, однак все ще ведуться серйозні дискусії про його точну роль на стадії виникнення, розвитку і завершенням ниркової недостатності. У нормальних умовах роль комплементу є корисною для хазяїна, однак неадекватна активація і відкладення комплементу можуть приводити до пошкодження тканин.
- 20 Існують переконливі докази того, що гломерулонефрит, запалення клубочків, часто ініціюється відкладенням імунних комплексів на структурах клубочків і каналців, з подальшим запуском активації комплементу, запалення і пошкоджень тканин. Kahn і Sinniah продемонстрували підвищене відкладення C5b-9 в базальних мембранах каналців в біопсійних зразках від пацієнтів з різними формами гломерулонефриту (Kahn, T.N., et al., Histopath. 26:351-6, 1995). У дослідженні з участю пацієнтів з IgA-нефропатією (Alexopoulos, A., et al., Nephrol. Dial. Transplant 10:1166-1172, 1995) відкладення C5b-9 в епітеліальних/базальних мембранних структурах клубочків корелювало з рівнями креатиніну в плазмі. Інше дослідження мембранозної нефропатії продемонструвало зв'язок між клінічним результатом і рівнями sC5b-9 в сечі (Kon, S.P., et al., Kidney Int. 48:1953-58, 1995). Підвищені рівні sC5b-9 позитивно корелювали з несприятливим прогнозом. Lehto з співавторами визначали підвищені рівні CD59, регуляторного фактора комплементу, який інгібує мембраноатакуючий комплекс в плазматичних мембранах, а також C5b-9 в сечі пацієнтів з мембранозним гломерулонефритом (Lehto, T., et al., Kidney Int. 47:1403-11, 1995). Гістопатологічний аналіз біопсійних зразків від тих же пацієнтів показав наявність відкладення білків C3 і C9 в клубочках, в той час як експресія CD59 в цих тканинах була знижена порівняно з такою в нормальній нирковій тканині. Результати цих досліджень вказують на те, що поточний опосередкований комплементом гломерулонефрит приводить до виведення з сечею білків комплементу, яке корелює зі ступенем пошкодження тканин і прогнозом захворювання.
- 40 Інгібування активації комплементу в різних тваринних моделях гломерулонефриту також продемонструвало важливість активації комплементу в етіології захворювання. У моделі мембранозно-проліферативного гломерулонефриту (MPGN) інфузія анти-Thy1 сироватки щурів з дефіцитом C6 (у яких не утворюється C5b-9) приводить до зменшення на 90 % проліферації клітин клубочків, зменшення на 80 % інфільтрації тромбоцитів і макрофагів, зменшення синтезу колагену IV типу (маркера збільшення об'єму мезангіального матриксу) і зменшення на 50 % протеїнурії, порівняно з C6+ нормальними щурами (Brandt, J., et al., Kidney Int. 49:335-343, 1996). Ці результати передбачають, що C5b-9 є основним медіатором пошкодження тканини комплементом в цій моделі на щурах з сироваткою проти тимоцитів. У іншій моделі гломерулонефриту інфузія градуйованих доз антитіл кролика проти базальної мембрани клубочків щурів приводила до залежної від дози притоку поліморфноядерних лейкоцитів (PMN), яка була ослаблена за рахунок попередньої обробки фактором отрути кобри (для знищення комплементу) (Scandrett, A.L., et al., Am. J. Physiol. 268:F256-F265, 1995). У щурів, яким вводили фактор отрути кобри, також спостерігали менш виражену гістопатологію, менш виражену довгострокову протеїнурію і більш низькі рівні креатиніну, ніж у контрольних щурів. Використовуючи три моделі GN у щурів (сироватку проти тимоцитів, Con A анти-Con A і пасивний нефрит Хеймана), Couser з співавторами продемонстрували потенційну терапевтичну ефективність підходів до інгібування комплементу з використанням рекомбінантного білка sCR1 (Couser, W.G., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5:1888-94, 1995). У щурів, що отримували sCR1, спостерігали значно менший притік PMN, тромбоцитів і макрофагів, зменшення мезангіолізу і протеїнурії порівняно з контрольними щурами. Додаткове свідчення на користь важливості активації комплементу при гломерулонефриті було отримане з використанням анти-C5 моАт в

моделі на мишах NZB/W F1. Анти-C5 моАт інгібує розщеплення C5, таким чином блокуючи утворення C5a і C5b-9. Постійне введення анти-C5 моАт протягом 6 місяців приводило до значного полегшення протікання гломерулонефриту. Гуманізоване анти-C5 моноклональне антитіло моАт (5G1.1), яке запобігає розщепленню людського компонента C5 комплементу на його прозапальні компоненти, розробляється компанією Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, як потенційний терапевтичний засіб для лікування гломерулонефриту.

Прямий доказ патологічної ролі комплементу в пошкодженні нирок був отриманий при вивченні пацієнтів з генетичним дефіцитом конкретних компонентів комплементу. У ряді звітів був задокументовано зв'язок ниркової недостатності з дефіцитом регуляторного фактора H комплементу (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). Дефіцит фактора H приводить до низьких рівнів в плазмі факторів B і C3 і поглинання C5b-9. Як атиповий мембранозно-проліферативний гломерулонефрит (MPGN), так і ідіопатичний гемолітичний уремичний синдром (HUS), пов'язані з дефіцитом фактора H. Свині з дефіцитом фактора H (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) і миші з нокаутом фактора H (Pickering, M.C., 2002) виявляють MPGN-подібні симптоми, що підтверджує важливість фактора H в регуляції комплементу. Дефіцит інших компонентів комплементу пов'язаний з нирковою недостатністю, що виникає в результаті системного червоного вовчака (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). Дефіцит C1q, C4 і C2 є сильним фактором схильності до розвитку SLE по механізмах, пов'язаних з порушенням кліренсу імунних комплексів і апоптотичного матеріалу. У багатьох з цих пацієнтів з SLE розвивається вовчаковий нефрит, що характеризується відкладенням імунних комплексів у всій клубочковій зоні.

Додаткові докази зв'язку активації комплементу з нирковою недостатністю були отримані при виявленні у пацієнтів аутоантитіл, направлених проти компонентів комплементу, деякі з яких були безпосередньо пов'язані з нирковою недостатністю (Trouw, L.A., et al., *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001). Багато з таких аутоантитіл демонструють настільки високий ступінь кореляції з нирковою недостатністю, що для визначення цієї активності був прийнятий термін "нефритний фактор" (NeF). У клінічних випробуваннях у приблизно 50 % пацієнтів з позитивними результатами аналізу на нефритний фактор розвивався MPGN (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992). C3NeF являє собою аутоантитіло, направлене проти C3-конвертази альтернативного шляху (C3bBb), і воно стабілізує цю конвертазу, тим самим стимулюючи активацію альтернативного шляху (Daha, M.R., et al., *J. Immunol.* 116:1-7, 1976). Аналогічно, аутоантитіло зі специфічністю для C3-конвертази класичного шляху (C4b2a), яке називається C4NeF, стабілізує цю конвертазу і, тим самим, стимулює активацію класичного шляху (Daha, M.R. et al., *J. Immunol.* 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., *J. Clin. Invest.* 65:1249-56, 1980). Показано, що анти-C1q аутоантитіла пов'язані з нефритом у пацієнтів з SLE (Hovath, L., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 19:667-72, 2001; Siegert, C., et al., *J. Rheumatol.* 18:230-34, 1991; Siegert, C., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:19-23, 1992), і повідомлялося про те, що зростання титру цих анти-C1q аутоантитіл дозволяє прогнозувати спалах нефриту (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995). Відкладення імунних комплексів, посмертне елювання з нирок пацієнтів з SLE, виявило накопичення цих анти-C1q аутоантитіл (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997). Всі ці факти вказують на патологічну роль цих аутоантитіл. Однак не у всіх пацієнтів з анти-C1q аутоантитілами розвивається ниркова недостатність і, крім того, деякі здорові індивідууми мають низькі титри таких анти-C1q аутоантитіл (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).

Крім альтернативного і класичного шляхів активації комплементу, лектиновий шлях також може грати важливу патологічну роль в розвитку ниркової недостатності. Підвищені рівні MBL, MBL-асоційованої серинової протеази і продуктів активації комплементу були виявлені імуногістохімічними методами в біопсійному матеріалі нирок, отриманому від пацієнтів з діагностованими декількома різними захворюваннями нирок, включаючи нефрит на фоні пурпури Геноха-Шенлейна (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000), кріоглобулінемічний гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., *Clin. Immunol.* 101:59-66, 2001) і IgA-невропатію (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001). Таким чином, незважаючи на той факт, що зв'язок між комплементом і захворюваннями нирок була відома протягом декількох десятиріч, дані про те, як саме комплемент впливає на ці захворювання нирок, є далеко не повними.

Захворювання крові

Сепсис викликається генералізованою реакцією пацієнта на проникаючі в тіло мікроорганізми. Основна функція системи комплементу полягає в організації запальної відповіді на бактерії, які вторгаються, і інші патогени. Відповідно до цієї фізіологічної ролі, активація

комплемента, як показано в численних дослідженнях, відіграє основну роль в патогенезі сепсису (Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991). Визначення клінічних виявів сепсису постійно розвивається. Сепсис звичайно визначають як системна відповідь хазяїна на інфекцію. Однак в багатьох випадках клінічні докази інфекції (наприклад, позитивні результати посіву крові на наявність бактерій) відсутні у пацієнтів з симптомами сепсису. Ця невідповідність уперше була врахована на консенсусній конференції в 1992 р., коли був прийнятий термін "синдром системної запальної відповіді" (SIRS), для якого не була потрібна наявність бактеріальної інфекції, що піддається визначенню (Bone, R.C., et al., *Crit. Care Med.* 20:724-726, 1992). У цей час існує загальна думка, що сепсис і SIRS пов'язані з нездатністю до регуляції запальної відповіді. Для цілей цього короткого огляду автори винаходу будуть вважати, що клінічне визначення сепсису також включає тяжкий сепсис, септичний шок і SIRS.

Переважаючим джерелом інфекції у пацієнтів з сепсисом до кінця 1980-х років були грамнегативні бактерії. Відомо, що ліпополісахарид (LPS), основний компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій, стимулює вивільнення медіаторів запальної відповіді з клітин різних типів і викликає симптоми гострої інфекції при введенні ін'єкцією тваринам (Haeney, M.R., et al., *Antimicrobial Chemotherapy* 41(Suppl. A):41-6, 1998). Цікаво, що спектр відповідальних мікроорганізмів, судячи з усього, змістився від переважно грамнегативних бактерій в кінці 1970-х і 1980-х років до переважно грампозитивних бактерій в цей час, з причин, які до сьогодні залишаються незрозумілими (Martin, G.S., et al., *N. Eng. J. Med.* 348:1546-54, 2003).

Результати багатьох досліджень демонструють важливість активації комплементу в медіації запалення і в розвитку ознак шоку, зокрема, септичного і геморагічного шоку. Звичайно септичний шок викликають як грамнегативні, так і грампозитивні, мікроорганізми. LPS є сильним активатором комплементу, переважно через альтернативний шлях, хоч також має місце активація через класичний шлях, опосередкований антитілами (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med.* 292:937-400, 1975). Основними компонентами клітинної стінки грампозитивних бактерій є пептидоглікан і ліпoteйхоева кислота, і обидва компоненти є сильними активаторами альтернативного шляху комплементу, хоча в присутності специфічних антитіл вони також можуть активувати класичний шлях комплементу (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

Початково припущення про участь системи комплементу в патогенезі сепсису було висловлене, коли досліджували помітили, що анафілатоксини C3a і C5a опосередковують різні запальні реакції, які також можуть мати місце при сепсисі. Ці анафілатоксини спричиняють розширення судин і збільшення проникності мікросудин, явища, які відіграють центральну роль при септичному шоку (Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions* 34:345-349, 1991). Крім того, анафілатоксини викликають бронхоспазм, вивільнення гістаміну з тучних клітин і агрегацію тромбоцитів. Крім того, вони надають численні ефекти на гранулоцити, наприклад, хемотаксис, агрегацію, адгезію, вивільнення лізосомальних ферментів, утворення токсичного супероксидного аніона і утворення лейкоцитринів (Shin, H.S., et al., *Science* 162:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3:177-86, 1986). Вважають, що ці біологічні ефекти грають роль в розвитку ускладнень сепсису, таких як шок або гострий респіраторний дистрес-синдром (ARDS) (Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet* 1:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery* 99:744-50, 1986). Крім того, підвищені рівні анафілатоксину C3a пов'язані зі смертельним кінцем при сепсисі (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med.* 86:20-26, 1989). У деяких тваринних моделях шоку певні лінії тварин з дефіцитом компонентів комплементу (наприклад, з дефіцитом C5) є більш стійкими до ефектів інфузії LPS (Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990).

Показано, що блокування антитілами утворення C5a на початку розвитку сепсису у гризунів сильно збільшує показники виживаності (Czermak, B.J., et al., *Nat. Med.* 5:788-792, 1999). Аналогічні результати були отримані при блокуванні рецептора C5a (C5aR) або антитілами, або низькомолекулярним інгібітором (Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J.* 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., *J. Clin. Invest.* 110:101-8, 2002). Результати ранніх експериментальних досліджень на мавпах вказували на те, що блокування антитілами C5a полегшувало септичний шок, що викликається *E. coli*, і респіраторний дистрес-синдром дорослих (Hangen, D.H., et al., *J. Surg. Res.* 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). У людей з сепсисом рівень C5a буває підвищений і пов'язаний зі значно зниженими показниками виживаності, в поєднанні з поліорганною недостатністю, порівняно з рівнем у пацієнтів з менш важким сепсисом і у пацієнтів, що вижили (Nakae, H., et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84:189-95, 1994; Nakae, et al., *Surg. Today* 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., *Arch. Surg.* 123:645-649, 1988). Механізми, за рахунок яких C5a надає свою шкідливу дію при сепсисі, ще має бути детально вивчати, однак останні дані вказують на те, що утворення C5a при сепсисі значно послаблює вроджені імунні функції нейтрофілів крові (Huber-Lang, M.S., et al., *J.*

Immunol. 169:3223-31, 2002), їх здатність здійснювати респіраторний вибух і їх здатність виробляти цитокіни (Riedemann, N.C., et al., Immunity 19:193-202, 2003). Крім того, утворення C5a при сепсисі, судячи з усього, надає прокоагулянтні ефекти (Laudes, I.J., et al., Am. J. Pathol. 160:1867-75, 2002). Комплемент-модуючий білок CI INH також виявляв ефективність в тваринних моделях сепсису і ARDS (Dickneite, G., Behring Ins. Mitt. 93:299-305, 1993).

Лектиновий шлях також може відіграти певну роль в патогенезі сепсису. Показано, що MBL зв'язує цілий ряд клінічно важливих мікроорганізмів, включаючи грамнегативні і грампозитивні бактерії, і активує лектиновий шлях (Neth, Про., et al., Infect. Immun. 68:688, 2000). Ліпотейхоєва кислота (LTA) все більше признається як аналог LPS у грампозитивних бактерій. Вона є сильним імуностимулятором, що індукує вивільнення цитокінів з мононуклеарних фагоцитів і цільної крові (Morath, S., et al., J. Exp. Med. 195:1635, 2002; Morath, S., et al., Infect. Immun. 70:938, 2002). Нещодавно було показано, що L-фіколін специфічно зв'язує LTA, виділену з різних видів грампозитивних бактерій, включаючи *Staphylococcus aureus*, і активує лектиновий шлях (Lynch, N.J., et al., J. Immunol. 172:1198-02, 2004). Також показано, що MBL зв'язує LTA з *Enterococcus spp.*, в якій полігліцерофосфатний ланцюг заміщений глікозильними групами, але не LTA з дев'яти інших видів, включаючи *S. aureus* (Polotsky, V.Y., et al., Infect. Immun. 64:380, 1996).

Таким чином, один з аспектів винаходу стосується способу лікування сепсису, або стану, пов'язаного з сепсисом, шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на сепсис, або стан, пов'язаний з сепсисом, включаючи, без обмеження, тяжкий сепсис, септичний шок, гострий респіраторний дистрес-синдром, який виникає в результаті сепсису, і синдром системної запальної відповіді. Пов'язані способи запропоновані для лікування інших захворювань крові, включаючи геморагічний шок, гемолітичну анемію, аутоімунну тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру (ТТП), гемолітичний уремічний синдром (HUS), атипичний гемолітичний уремічний синдром (aHUS) або інші руйнівні стани кісткового мозку/крові, шляхом введення композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу в фармацевтичному носії суб'єкту, який страждає на такий стан. Інгібуючий MASP-2 засіб вводять суб'єкту системно, наприклад, внутрішньоартеріальним, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інгаляційним (особливо у випадку ARDS), підшкірним або іншим парентеральним шляхом введення, або, потенційно, пероральним шляхом введення у випадку не пептидергічних засобів. Композицію інгібуючого MASP-2 засобу можна об'єднувати з одним або більше додатковими терапевтичними засобами для боротьби з наслідками сепсису і/або шоку. При прогресуючому сепсисі або шоку, або стані дистресу, пов'язаному з ним, інгібуючу MASP-2 композицію, переважно, можна вводити в швидкодіючій лікарській формі, наприклад, шляхом болюсної внутрішньовенної або внутрішньоартеріальної доставки розчину, що містить композицію інгібуючого MASP-2 засобу. Повторне введення можна здійснювати за рішенням лікаря, до усунення цього стану.

Коагулопатії

Був отриманий доказ ролі системи комплементу в розвитку дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції ("DIC"), такої як DIC внаслідок обширної травми тіла.

У попередніх дослідженнях було показано, що миші C4-/- не захищені від реперфузійного ушкодження нирок. (Zhou, W., et al., "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury" J Clin Invest 105:1363-1371 (2000)). Для вивчення того, чи може у мишей C4-/- все ще активуватися комплемент через класичний або лектиновий шлях, був визначений оборот C3 в плазмі тварин C4-/- в аналізах, специфічних для активації або класичного, або лектинового шляху. Хоча розщеплення C3 було відсутнє при ініціації активації через класичний шлях, спостерігали високоефективну залежну від лектинового шляху активацію C3 в дефіцитній по C4 сироватці (ФІГУРА 30). Можна бачити, що відкладення C3b на манані і зимозані сильно порушене у мишей MASP-2-/-, навіть в експериментальних умовах, що відповідно до багатьох раніше опублікованих робіт по активації альтернативного шляху, повинне бути вирішальним для всіх трьох шляхів. При використанні тієї ж сироватки в ямках, покритих імуноглобуліновими комплексами замість манану або зимозану, відкладення C3b і розщеплення фактора В спостерігали в мишачій сироватці MASP-2+/+ і сироватці MASP-2-/-, але не у виснаженій по C1q сироватці. Це вказує на те, що активація альтернативного шляху спрощується в сироватці MASP-2-/-, коли початковий C3b забезпечений за рахунок активності класичного шляху. На ФІГУРІ 30С представлений той дивний результат, що C3 може бути ефективно активований залежним від лектинового шляху чином в дефіцитній по C4 плазмі.

Цей "обхід C4" ліквідується при інгібуванні активації лектинового шляху за рахунок преінкубації плазми з розчинними мананом або манозою.

Аберантна, не імунна, активація системи комплементу є потенційно небезпечною для людини і також може відігравати важливу роль в активації гематологічного шляху, зокрема, у випадку важкої травми, коли активовані і запальний, і гематологічний, шляхи. У нормі результатом конверсії C3 є <5 % сумарного білка C3 в плазмі. При сильній інфекції, включаючи септицемію і хворобу імунних комплексів, конверсія C3 зростає до рівня приблизно 30 %, часто з рівнями комплементу нижче нормальних рівнів, внаслідок підвищеної утилізації і змін в розподілі пулу. Пряма активація шляху C3 до рівня більше 30 %, як правило, приводить до явних клінічних виявів розширення судин і витоку рідини в тканині. При конверсії C3 вище 30 % ініціюючі механізми переважно є не імунними, і виникаючі клінічні вияви є шкідливими для пацієнта. Рівні C5 комплементу в здоровому стані і при контрольованому захворюванні здаються набагато більш стабільними, ніж рівні C3. Значне зменшення і/або зміна рівнів C5 пов'язане з відповіддю пацієнта на аномальну політравму (наприклад, при дорожньо-транспортному випадку), і можливо розвиток синдромів "шокової" легені. Таким чином, будь-яке свідчення активації C3 комплементу на рівні вище 30 % судинного пула, або будь-якого залучення C5, або і того, і іншого, можна вважати ймовірним передвісником шкідливих патологічних змін в організмі пацієнта.

Як C3, так і C5, вивільняють анафілатоксини (C3a і C5a), які діють на тучні клітини і базофіли, приводячи до вивільнення судинорозширювальних хімічних речовин. Вони створюють градієнти для хемотаксису, які направляють поліморфноядерні клітини (PMN) в центр імунологічний порушень (корисна відповідь), але тут вони відрізняються, оскільки C5a має специфічний аглютинуючий (агрегуючий) ефект на ці фагоцитуючі клітини, що запобігає їх випадковому видаленню з ділянки реакції. При нормальному контролі інфекції C3 активує C5. Однак при політравмі C5, судячи з усього, масштабно активується, системно генеруючи анафілатоксини C5a. Ця неконтрольована активність викликає аглютинацію поліморфних форм в судинній системі, і ці грудки потім змиваються в капіляри легень, де вони викликають оклюзію і надають локальну ушкоджуючу дію за рахунок вивільнення супероксиду. Без зв'язку з конкретною теорією, даний механізм можливо важливий в патогенезі гострого респіраторного дистрес-синдрому (ARDS), хоча ця точка зору нещодавно була піддана сумніву. Анафілатоксини C3a *in vitro* можуть демонструвати сильні агрегуючі властивості відносно тромбоцитів, однак їх участь *in vivo* менш зрозуміла, і вивільнення речовин тромбоцитів і плазміну при загоєнні рани може лише повторно включати C3 комплементу. Можливо, що тривале підвищення рівня активації C3 необхідне для виникнення DIC.

Крім клітинних і судинних ефектів активованих компонентів комплементу, описаних вище, які могли б пояснити зв'язок між травмою і DIC, наукові результати, які з'являються, виявили прямі молекулярні зв'язки і функціональний взаємозв'язок між системами комплементу і коагуляції. Підтверджуючі дані були отримані в дослідженнях на мишах з дефіцитом C3. Оскільки C3 є загальним компонентом всіх шляхів комплементу, очікується, що миші з дефіцитом C3 будуть позбавлені всіх функцій комплементу. Дивно, але у мишей з дефіцитом C3 можуть повністю активуватися термінальні компоненти комплементу. (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway", *Nat. Med* 12:682-687 (2006)). Поглиблені дослідження показали, що C3-незалежна активація термінальних компонентів комплементу опосередковується тромбіном, швидкість-лімітуючим ферментом каскаду коагуляції. (Huber et al., 2006). Молекулярні компоненти, які опосередковують активацію тромбіну після початкової активації комплементу, залишаються незрозумілими.

Автори даного винаходу з'ясували те, що вважають молекулярною основою взаємозв'язку між комплементом і каскадом коагуляції, і ідентифікували MASP-2 як центральну контрольну точку, яка зв'язує дві системи. Біохімічні дослідження субстратної специфічності MASP-2 виявили протромбін як можливий субстрат, в доповнення до добре відомих білків C2 і C4 комплементу. MASP-2 специфічно розщеплює протромбін в функціонально важливих сайтах, з утворенням тромбіну, швидкість-лімітуючого ферменту каскаду коагуляції. (Krarup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2", *PLoS. ONE*. 2:e623 (2007)). Створений за рахунок MASP-2 тромбін здатний стимулювати відкладення фібрину в певній відновленій *in vitro* системі, що демонструє функціональну важливість розщеплення за рахунок MASP-2. (Krarup et al., 2007). Як описано в прикладах, наведених нижче в цьому документі, автори винаходу додатково підтвердили фізіологічну важливість цього відкриття, документуючи активацію тромбіну в нормальній сироватці гризунів після активації лектинового шляху, і продемонстрували, що цей процес блокується нейтралізуючими MASP-2 моноклональними антитілами.

MASP-2 може являти собою центральну точку гілкування в лектиновому шляху, здатну стимулювати активацію як системи комплементу, так і системи коагуляції. Оскільки активація

лектинового шляху є фізіологічною відповіддю на багато видів травматичного ушкодження, автори даного винаходу вважають, що системне запалення (опосередковане компонентами комплементу) і дисеміновану коагуляцію (опосередковану шляхом коагуляції), які відбуваються одночасно, можна пояснити здатністю MASP-2 активувати обидва шляхи. Ці результати виразно свідчать про роль MASP-2 у виникненні DIC і терапевтичній користі інгібування MASP-2 при лікуванні або запобіганні DIC. MASP-2 може забезпечувати молекулярний зв'язок між системами комплементу і коагуляції, і активація лектинового шляху, що має місце в умовах травми, може безпосередньо ініціювати активацію системи коагуляції через вісь MASP-2-тромбін, забезпечуючи механістичний зв'язок між травмою і DIC. Відповідно до одного з аспектів даного винаходу інгібування MASP-2 привело б до інгібування активації лектинового шляху і зменшення утворення обох анафілатоксинів, C3a і C5a. Вважається, що тривале підвищення рівня активації C3 необхідне для виникнення DIC.

Мікросудинна коагуляція (згустки крові в капілярах і дрібних кровоносних судинах) відбувається в таких ситуаціях як септичний шок. Роль лектинового шляху при септичному шоку встановлена, про що свідчить захисний фенотип MASP-2 (-/-) в мишачих моделях сепсису, як описано в прикладі 17 і на ФІГУРАХ 18 і 19. Крім того, як продемонстровано в прикладі 15 і на ФІГУРАХ 16A і 16B, миші MASP-2 (-/-) захищені в умовах локалізованої реакції Шварцмана, моделі дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції (DIC) і моделей локалізованої коагуляції в мікросудинах.

V. Інгібуючі MASP-2 засоби

У одному аспекті даний винахід стосується способів інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії. Інгібуючі MASP-2 засоби вводять в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта. При здійсненні на практиці винаходу репрезентативні інгібуючі MASP-2 засоби включають: молекули, які інгібують біологічну активність MASP-2 (такі як низькомолекулярні інгібітори, анти-MASP-2 антитіла або блокуючі пептиди, які взаємодіють з MASP-2 або перешкоджають білок-білковим взаємодіям), і молекули, які зменшують експресію MASP-2 (такі як антисмислові молекули нуклеїнової кислоти MASP-2, специфічні для MASP-2 молекули РНКі і рибозими MASP-2), ці молекули запобігають активації лектинового шляху комплементу за рахунок MASP-2. Інгібуючі MASP-2 засоби можна використовувати окремо як основну терапію або в поєднанні з іншими терапевтичними засобами як ад'ювантну терапію для посилення терапевтичної користі від лікування іншими препаратами.

Інгібування MASP-2-залежної активації комплементу характеризується щонайменше однією з наступних змін в компонентах системи комплементу, які відбуваються внаслідок введення інгібуючого MASP-2 засобу відповідно до способів за винаходом: інгібування утворення або продукування продуктів MASP-2-залежної активації комплементу, C4b, C3a, C5a і/або C5b-9 (MAC) (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 2), зменшення активації комплементу при оцінці в аналізі гемолізу з використанням не сенсibilізованих еритроцитів кролика або морської свинки (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 33), зменшення розщеплення C4 і відкладення C4b (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 2) або зменшення розщеплення C3 і відкладення C3b (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 2).

Відповідно до даного винаходу використовують інгібуючі MASP-2 засоби, які ефективні для інгібування MASP-2-залежної системи активації комплементу. Інгібуючі MASP-2 засоби, корисні при здійсненні на практиці даного аспекту винаходу, включають, наприклад, анти-MASP-2 антитіла і їх фрагменти, які інгібують MASP-2 пептиди, малі молекули, розчинні рецептори MASP-2 і інгібітори експресії MASP-2. Інгібуючі MASP-2 засоби можуть інгібувати MASP-2-залежну систему активації комплементу шляхом блокування біологічної функції MASP-2. Наприклад, інгібуючий засіб може ефективно блокувати білок-білкові взаємодії MASP-2, перешкоджати димеризації або збиранню MASP-2, блокувати зв'язування Ca²⁺, блокувати активний центр серинової протеази MASP-2, або можуть спричинити зменшення експресії білка MASP-2.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 засоби вибірково інгібують MASP-2-залежну активацію комплементу, при цьому не торкаючись функціонально C1q-залежної системи активації комплементу.

У одному варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб, корисний в способах за винаходом, являє собою специфічний інгібуючий MASP-2 засіб, який специфічно зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 6, з афінністю, щонайменше в десять разів більшою, ніж афінність для інших антигенів в системі комплементу. У іншому варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 засіб

специфічно зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 6, з афінністю зв'язування, щонайменше в 100 раз більшою, ніж афінність для інших антигенів в системі комплементу. Афінність зв'язування для інгібуючого MASP-2 засобу можна визначати з використанням відповідного аналізу зв'язування.

Поліпептид MASP-2 має молекулярну структуру, аналогічну структурі MASP-1, MASP-3, C1r і C1s, протеаз C1 системи комплементу. Молекула кДНК з послідовністю SEQ ID NO: 4 кодує репрезентативний приклад MASP-2 (що складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 5) і забезпечує продукування людського поліпептиду MASP-2 з послідовністю лідера (ак 1-15), яка відщеплюється після секреції, з утворенням зрілої форми людського MASP-2 (SEQ ID NO: 6). Як показано на ФІГУРІ 2, ген людського MASP-2 містить дванадцять екзонів. кДНК людського MASP-2 закодована екзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K і L. Альтернативний сплайсинг приводить до утворення 20 кДа білка, який називається MBL-асоційованим білком 19 ("MAP19", інша назва "sMAP") (SEQ ID NO: 2), закодованого (SEQ ID NO: 1), що походить з екзонів B, C, D і E, як показано на ФІГУРІ 2. Молекула кДНК з послідовністю SEQ ID NO: 50 кодує мишачий MASP-2 (який складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 51) і забезпечує продукування поліпептиду мишачого MASP-2 з послідовністю лідера, яка відщеплюється після секреції, з утворенням зрілої форми мишачого MASP-2 (SEQ ID NO: 52). Молекула кДНК з послідовністю SEQ ID NO: 53 кодує щурячий MASP-2 (той, що складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 54) і забезпечує продукування поліпептиду щурячого MASP-2 з послідовністю лідера, яка відщеплюється після секреції, з утворенням зрілої форми щурячого MASP-2 (SEQ ID NO: 55).

Фахівці в даній галузі розуміють, що послідовності, розкриті в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 і SEQ ID NO: 53, являють собою окремі алелі людського, мишачого і щурячого MASP-2, відповідно, і що передбачена можливість алельних варіацій і альтернативний сплайсингу. Алельні варіанти нуклеотидних послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 і SEQ ID NO: 53, включаючи варіанти, що містять мутації, що мовчать, і варіанти, в яких мутації приводять до змін амінокислотної послідовності, входять в об'єм даного винаходу. Алельні варіанти послідовності MASP-2 можуть бути клоновані шляхом дослідження кДНК або геномних бібліотек від різних індивідуумів стандартними методами.

Домени людського білка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) показані на ФІГУРАХ 1 і 2A, і включають N-кінцевий домен C1r/C1s/VEGF морського їжака/кісткового морфогенетичного білка (CUBI) (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6), подібний епідермальному фактора росту домен (ак 122-166), другий домен CUBI (ак 167-293), а також тандем доменів контрольного білка комплементу і домен серинової протеази. Альтернативний сплайсинг гена MASP-2 приводить до утворення MAP19, показаного на ФІГУРІ 1. MAP19 являє собою не ферментативний білок, що містить N-кінцеву ділянку CUB1-EGF з MASP-2 з чотирма додатковими залишками (EQSL), які походять з екзона E, як показано на ФІГУРІ 1.

Деякі білки, як показано, зв'язуються, або взаємодіють, з MASP-2 шляхом білок-білкових взаємодій. Наприклад, відомо, що MASP-2 зв'язується і утворює Ca^{2+} -залежні комплекси з лектиновими білками MBL, Н-фіколіном і L-фіколіном. Кожний комплекс MASP-2/лектин, як показано, активує комплемент шляхом MASP-2-залежного розщеплення білків C4 і C2 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Результати досліджень показали, що домени CUB1-EGF в MASP-2 необхідні для зв'язку MASP-2 з MBL (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Також було показано, що домени CUB1EGFCUBII опосередковують димеризацію MASP-2, яка необхідна для утворення активного комплексу MBL (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Таким чином, можуть бути ідентифіковані інгібуючі MASP-2 засоби, які зв'язують або блокують цільові області MASP-2, які, як відомо, важливі для MASP-2-залежної активації комплементу.

50 Анти-MASP-2 антитіла

У деяких варіантах здійснення даного аспекту винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, яке інгібує MASP-2-залежну систему активації комплементу. Анти-MASP-2 антитіла, корисні для даного аспекту винаходи, включають поліклональні, моноклональні і рекомбінантні антитіла, отримані від будь-якого ссавця, який продукує антитіла, і можуть являти собою мультиспецифічні, химерні, гуманізовані, антиідіотипічні антитіла, а також фрагменти антитіл. Фрагменти антитіл включають фрагменти Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, фрагменти scFv і однокланцюжкові антитіла, описані далі в цьому документі.

Деякі анти-MASP-2 антитіла були описані в літературі, деякі з них перераховані нижче в ТАБЛИЦІ 1. Ці раніше описані анти-MASP-2 антитіла можна піддавати скринінгу на здатність до інгібування MASP-2-залежної системи активації комплементу з використанням аналізів,

- описаних в цьому документі. Наприклад, були ідентифіковані Fab2 антитіла проти щурячого MASP-2, які блокують MASP-2-залежну активацію комплементу, як описано більш детально в цьому документі в прикладах 10 і 11. Після ідентифікації анти-MASP-2 антитіла, яке діє як інгібуючого MASP-2 засіб, його можна використовувати для отримання антиідіотипічних антитіл, а також використовувати для ідентифікації інших зв'язувальних MASP-2 молекул, як додатково описано нижче.

Таблиця 1:

MASP-2-СПЕЦИФІЧНІ АНТИТІЛА, ОПИСАНІ В ЛІТЕРАТУРІ

АНТИГЕН	ТИП АНТИТІЛА	ПОСИЛАННЯ
Рекомбінантний MASP-2	Поліклональне щуряче	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000
Рекомбінантний людський фрагмент CCP1/2-SP (моАт 8B5)	Щуряче моАт (підклас IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
Рекомбінантний людський MAP19 (моАт 6G12) (перехресно реагує з MASP-2)	Щуряче моАт (підклас IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
hMASP-2	Мишаче моАт (S/P) Мишаче моАт (N-кінець)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (домен CCP1-CCP2-SP)	Щуряче моАт: Nimoab101, що продукується лінією клітин гібридоми 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (повнорозмірний з his-міткою)	Мишачі моАт: NimoAb104, що продукується лінією клітин гібридоми M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, що продукується лінією клітин гібридоми M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109, що продукується лінією клітин гібридоми M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110, що продукується лінією клітин гібридоми M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384

Анти-MASP-2 антитіла з редукованою ефекторною функцією

- У деяких варіантах здійснення даного аспекту винаходу анти-MASP-2 антитіла мають редуковану ефекторну функцію для зменшення запалення, яке може виникати внаслідок активації класичного шляху комплементу. Здатність молекул IgG запускати класичний шлях комплементу, як було продемонстровано, пов'язана з Fc-частиною молекули (Duncan, A.R., et al., Nature 332:738-740 1988). Молекули IgG, в яких Fc-частина молекули була видалена шляхом ферментативного розщеплення, позбавлені цієї ефекторної функції (дивись Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Відповідно, можуть бути отримані антитіла з редукованою ефекторною функцією внаслідок відсутності Fc-частини молекули шляхом створення генетично модифікованої послідовності Fc, яка має мінімальну ефекторну функцію, або стосується ізо типу IgG2 або IgG4 антитіл людини.
- Антитіла з редукованою ефекторною функцією можуть бути отримані шляхом стандартних молекулярно-біологічних маніпуляцій з Fc-частиною важких ланцюгів IgG, як описано в цьому

документі в Прикладі 9, і також описано в публікаціях Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol. 10:241-250, 1993, і Rodrigues et al., J. Immunol. 151:6954-6961, 1998. Антитіла з редукованою ефекторною функцією також включають людські антитіла ізотипів IgG2 і IgG4, які мають редуковану здатність активувати комплемент і/або взаємодіяти з 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). Гуманізовані або повністю людські антитіла, специфічні для людського MASP-2, ізотипів IgG2 або IgG4 можуть бути отримані одним з ряду способів, відомих фахівцям в даній галузі, як описано в Vaughan, T.J., et al., Nature Biotechnical 16:535-539, 1998.

Отримання анти-MASP-2 антитіл

Анти-MASP-2 антитіла можуть бути отримані з використанням поліпептидів MASP-2 (наприклад, повнорозмірного MASP-2) або з використанням антигенних пептидів, які несуть епітоп MASP-2 (наприклад, частини поліпептиду MASP-2). Імуногенні пептиди можуть мати довжину не більш п'яти амінокислотних залишків. Наприклад, поліпептид MASP-2, що містить повну амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6, можна використовувати для індукції анти-MASP-2 антитіл, корисних в способі за винаходом. Конкретні домени MASP-2, які, як відомо, залучені до білок-білкових взаємодій, наприклад, домени CUBI і CUBIEGF, а також ділянку, яка включає активний центр серинової протеази, можна експресувати у вигляді рекомбінантних поліпептидів, як описано в прикладі 3, і використовувати як антигени. Крім того, пептиди, що містять частину зі щонайменше 6 амінокислот поліпептиду MASP-2 (SEQ ID NO: 6), також можуть бути використані для індукції анти-MASP-2 антитіл. Додаткові приклади отриманих з MASP-2 антигенів, корисних для індукції анти-MASP-2 антитіл, наведені нижче в ТАБЛИЦІ 2. Пептиди і поліпептиди MASP-2, що використовуються для отримання антитіл, можна отримувати у вигляді природних поліпептидів, або рекомбінантних або синтетичних пептидів, а також каталітично неактивних рекомбінантних поліпептидів, таких як MASP-2A, як додатково описано в прикладах 5-7. У деяких варіантах здійснення даного аспекту винаходу анти-MASP-2 антитіла отримують з використанням трансгенної лінії мишей, як описано в прикладах 8 і 9, і додатково описано нижче.

Антигени, які можуть бути використані для отримання анти-MASP-2 антитіл, також включають злиті поліпептиди, такі як продукти злиття MASP-2, або його частини, з поліпептидом імуноглобуліну або з мальтоза-зв'язувальним білком. Поліпептидний імуноген може являти собою повнорозмірну молекулу або її частину. Якщо частина поліпептиду подібна гаптену, таку частину можна успішно об'єднувати або зв'язувати з макромолекулярним носієм (таким як гемоціанін морського блюдця (KLH), бичачий сироватковий альбумін (BSA) або токсод правця) для імунізації.

Таблиця 2:

ОТРИМАНІ З MASP-2 АНТИГЕНИ

SEQ ID NO:	Амінокислотна послідовність
SEQ ID NO: 6	Людський білок MASP-2
SEQ ID NO: 51	Мишачий білок MASP-2
SEQ ID NO: 8	Домен CUBI людського MASP-2 (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Домени CUBIEGF людського MASP-2 (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Домени CUBIEGFCUBII людського MASP-2 (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Домен EGF людського MASP-2 (ак 122-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 12	Домен серинової протеази людського MASP-2 (ак 429-671 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 13	Мутантна форма інактивованої серинової протеази (ак 610-625 в SEQ ID NO: 6 з мутацією Ser 618)
SEQ ID NO: 14	Людський пептид CUBI
SEQ ID NO: 15	Людський пептид CUBI
SEQ ID NO: 16	MBL-зв'язувальна ділянка в людському домені CUBI

ОТРИМАНІ З MASP-2 АНТИГЕНИ

SEQ ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	MBL-зв'язувальна ділянка в людському домені CUBI
SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG	Пептид EGF
SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLES GGK DSCRGD SGGAL V	Пептид з активного центра серинової протеази

Поліклональні антитіла

Поліклональні антитіла проти MASP-2 можна отримувати шляхом імунізації тварини поліпептидом MASP-2, або його імуногенним фрагментом, з використанням способів, добре відомих фахівцям в даній галузі. Дивись, наприклад, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", в: Immunochemical Protocols (Manson, ed.), стор. 105, а також опис в прикладі 6. Імуногенність поліпептиду MASP-2 можна підвищувати за рахунок використання ад'юванта, включаючи мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, або ад'ювант Фрейнда (повний або неповний), поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, поліолі типу плуронік®, поліаніони, масляні емульсії, гемоціанін морського блюдця і динітрофенол. Поліклональні антитіла, як правило, отримують у таких тварин, як коня, корови, собаки, кури, щури, миші, кролики, морські свинки, кози або вівці. Альтернативно, анти-MASP-2 антитіло, корисно за даним винаходом, також можна отримувати у приматів. Загальні методи отримання корисних для діагностики і терапії антитіл у бабуїнів описані, наприклад, в Goldenberg et al., міжнародної публікації патенту № WO 91/11465, і в публікації Losman, M.J., et al., Int. J. Cancer 46:310, 1990. З крові таких імунізованих тварин потім отримують сироватку, що містить імунологічний активні антитіла, стандартними методами, добре відомими в даній галузі.

Моноклональні антитіла

У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 моноклональне антитіло. Анти-MASP-2 моноклональні антитіла є високоспецифічними, направлені проти одного епітопа MASP-2. Використовуване в цьому документі визначення "моноклональне" вказує на характер антитіла, як отриманого з практично гомогенної популяції антитіл, і його не треба розуміти як вказівку на необхідність отримання антитіла яким-небудь конкретним методом. Моноклональні антитіла можна отримувати з використанням будь-якого методу, який приводить до продукування молекул антитіла стабільними клітинними лініями в культурі, такого як метод гібридом, описаний в Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975, або їх можна отримувати методами рекомбінантних ДНК (дивись, наприклад, патент США № 4816567, виданий Cabilly). Моноклональні антитіла також можна отримувати з бібліотек антитіл в фаге з використанням методів, описаних в Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991, і Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991. Такі антитіла можуть стосуватися будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, а також будь-якого їх підкласу.

Наприклад, моноклональні антитіла можна отримувати, вводючи ін'єкцією відповідному ссавцю (наприклад, миші BALB/c) композицію, що містить поліпептид MASP-2 або його частину. Через певний період часу спленоцити витягують з миші і суспендують в середовищі для культивування клітин. Потім проводять злиття спленоцитів з іморталізованими лінійними клітинами, отримуючи гібридом. Отримані гібридами вирощують в середовищі для культивування клітин і проводять їх скринінг на здатність продукувати моноклональне антитіло проти MASP-2. Більш детально продукування анти-MASP-2 моноклональних антитіл описане в прикладі 7. (Дивись також Current Protocols in Immunology, Vol. 1., John Wiley & Sons, сторінки 2.5.1-2.6.7, 1991).

Людські моноклональні антитіла можна отримувати шляхом використання трансгенних мишей, які були генетично модифіковані для продукування специфічних людських антитіл у відповідь на введення антигена. У цьому методі елементи локусу важкого і легкого ланцюгів людського імуноглобуліну вводять лінійним мишам, отриманим з використанням ліній ембріональних стовбурових клітин, які мають таргетовані порушення в локусах важкого і легкого ланцюгів ендогенних імуноглобулінів. Трансгенні миші можуть синтезувати людські антитіла, специфічні для людських антигенів, таких як антигени MASP-2, описані в цьому документі, і мишей можна використовувати для отримання гібридом, які секретують анти-MASP-2 антитіло, шляхом злиття В-клітин від таких тварин з відповідними лінійними клітинами міеломи з використанням загальноприйнятої технології Келлера-Мільштейна, як додатково описано в

прикладі 7. Трансгенні миші з генами людських імуноглобулінів комерційно доступні (наприклад, від Abgenix, Inc., Fremont, CA, і Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Методи отримання людських антитіл від трансгенних мишей описані, наприклад, в Green, L.L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature* 368:856, 1994; і Taylor, L.D., et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Моноклональні антитіла можна виділяти і очищати з культури гібридом різними добре відомими методами. Такі методи виділення включають афінну хроматографію на протеїн А-сефарозі, ексклюзійну хроматографію і іонообмінну хроматографію (дивись, наприклад, Coligan на сторінках 2.7.1-2.7.12 і сторінках 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, сторінки 79-104, 1992).

Після отримання поліклональні, моноклональні або отримані у фагу антитіла спочатку тестують на специфічне зв'язування MASP-2. Можна використовувати різні аналізи, відомі фахівцям в даній галузі, для виявлення антитіл, які специфічно зв'язують MASP-2. Ілюстративні аналізи включають вестерн-блот аналіз або аналіз імунопреципітації стандартними методами (наприклад, як описано в Ausubel et al.), імуноелектрофорез, імуноферментні аналізи, дот-блот аналіз, аналізи інгібування або конкуренції, і аналізи в сендвіч-форматі (описано в Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Після ідентифікації антитіл, які специфічно зв'язують MASP-2, анти-MASP-2 антитіла тестують на здатність діяти як інгібуючий MASP-2 засіб в одному з ряду аналізів, наприклад, в аналізі лектин-специфічного розщеплення C4 (описаному в прикладі 2), аналізі відкладення C3b (описаному в прикладі 2) або аналізі відкладення C4b (описаному в прикладі 2).

Афінність анти-MASP-2 моноклональних антитіл може з легкістю визначати фахівець в даній галузі (дивись, наприклад, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 51:660-672, 1949). У одному варіанті здійснення анти-MASP-2 моноклональні антитіла, корисні в способах за винаходом, зв'язують MASP-2 з афінністю зв'язування <100 нМ, переважно <10 нМ і найбільш переважно <2 нМ. У деяких варіантах здійснення інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло, корисне в способах за винаходом, являє собою інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; і ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; і iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, і b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; і ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; і iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіант, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

Химерні/гуманізовані антитіла

Моноклональні антитіла, корисні в способі за винаходом, включають химерні антитіла, в яких частина важкого і/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від конкретних біологічних видів або що належать до конкретного класу або підкласу антитіл, при цьому інша частина ланцюга(ів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від іншого біологічного виду або що належать до іншого класу або підкласу антитіл; а також фрагменти таких антитіл (патент США № 4816567, виданий Cabilly; і Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984).

Однією з форм химерного антитіла, корисного за винаходом, є гуманізоване моноклональне анти-MASP-2 антитіло. Гуманізовані форми антитіл, що не належать людині (наприклад, мишачих) являють собою химерні антитіла, що містять мінімальну послідовність з імуноглобуліну, що не належить людині. Гуманізовані моноклональні антитіла отримують шляхом перенесення ділянок, які визначають комплементарність (CDR), антитіла, що не належить людині (наприклад, мишачого), з варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів мишачого імуноглобуліну у варіабельний домен людського антитіла. Як правило, залишки людського антитіла потім вводять в каркасні ділянки для заміни відповідних залишків, що не належать людині. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, відсутні в

реципієнтному антитілі або в донорському антитілі. Ці модифікації виконують для додаткового вдосконалення функціонування антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити практично всі зі щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів, в яких всі, або практично всі, з гіперваріабельних петель відповідають таким у імуноглобуліну, що не належить

людині, а всі, або практично всі, з каркасних ділянок Fv мають послідовність людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло, необов'язково, також буде містити щонайменше частину константної області (Fc) імуноглобуліну, як правило, константної області людського імуноглобуліну. Для детальної інформації дивись Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., *Nature* 332:323-329, 1988; і Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992.

Гуманізовані антитіла, корисні за винаходом, включають людські моноклональні антитіла, що містять щонайменше MASP-2-зв'язувальну ділянку CDR3. Крім того, Fc-ділянки можуть бути замінені, з тим щоб отримувати IgA або IgM, а також IgG антитіла людини. Такі гуманізовані антитіла будуть мати конкретне клінічне застосування, оскільки вони будуть специфічно впізнавати людський MASP-2, але не будуть індукувати імунну відповідь у людини проти самого антитіла. Отже, вони більше підходять для *in vivo* введення людині, особливо, якщо необхідне повторне або довгострокове введення.

Отримання гуманізованого анти-MASP-2 антитіла з мишачого анти-MASP-2 моноклонального антитіла описане в цьому документі в прикладі 6. Методи отримання

гуманізованих моноклональних антитіл також описані, наприклад, в Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., *J. Immun.* 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", в: *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., сторінки 399-434, 1996; і в патенті США № 5693762, виданому Queen, 1997. Крім того, існують комерційні організації, які синтезують гуманізовані антитіла з конкретних ділянок мишачого антитіла, наприклад, Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбінантні антитіла

Анти-MASP-2 антитіла також можна отримувати з використанням рекомбінантних методів. Наприклад, людські антитіла можна отримувати з використанням експресійних бібліотек людських імуноглобулінів (доступних, наприклад, від компанії Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для отримання фрагментів людських антитіл (VH, VL, Fv, Fd, Fab або F(ab')₂). Ці фрагменти потім використовують для конструювання цілих людських антитіл з використанням методів, аналогічних методам отримання химерних антитіл.

Антиідіотипічні антитіла

Після ідентифікації анти-MASP-2 антитіл з потрібною інгібуючою активністю ці антитіла можна використовувати для отримання антиідіотипічних антитіл, що мають схожість з частиною MASP-2, з використанням методів, добре відомих в даній галузі. Дивись, наприклад, Greenspan, N.S., et al., *FASEB J.* 7:437, 1993. Наприклад, антитіла, які зв'язують MASP-2 і повністю інгібують взаємодії білка MASP-2, необхідні для активації комплексу, можна використовувати для отримання антиідіотипічних антитіл, що мають схожість з сайтом зв'язування MBL на білку MASP-2, і, отже, зв'язувати і нейтралізувати зв'язування ліганду MASP-2, такого як, наприклад, MBL.

Фрагменти імуноглобулінів

Інгібуючі MASP-2 засоби, корисні в способі за винаходом, включають не тільки інтактні молекули імуноглобулінів, але також і добре відомі фрагменти, включаючи фрагменти Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ і Fv, scFv фрагменти, діатіла, лінійні антитіла, одноланцюжкові молекули антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

У даній галузі добре відомо, що лише невелика частина молекули антитіла, паратоп, бере участь в зв'язуванні антитіла з його епітопом (дивись, наприклад, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Ділянки pFc' і Fc антитіла є ефекторами класичного шляху комплексу, але не беруть участь в зв'язуванні антигена. Антитіло, від якого ділянка pFc' була ферментативно відщеплена, або яке було отримане без ділянки pFc', називається фрагментом F(ab')₂ і зберігає обидва антигензв'язувальні сайти інтактного антитіла. Виділений фрагмент F(ab')₂ називають бівалентним моноклональним фрагментом через його два антигензв'язувальні сайти. Аналогічно, антитіло, від якого ділянка Fc була ферментативно відщеплена, або яке було отримане без ділянки Fc, називається фрагментом Fab і зберігає один з антигензв'язувальних сайтів інтактною молекули антитіла.

Фрагменти антитіл можна отримувати шляхом протеолітичного гідролізу, наприклад, розщеплення пепсином або папаїном, цілого антитіла загальноприйнятими методами. Наприклад, фрагменти антитіл можна отримувати шляхом ферментативного розщеплення

антитіл пепсином, з отриманням 5S фрагмента, який називається F(ab')₂. Цей фрагмент можна додатково розщеплювати з використанням відновлювального тіолової групи реагенту, з отриманням 3,5 S одновалентних фрагментів Fab'. Необов'язково, реакцію розщеплення можна проводити з використанням блокуючої групи для сульфгідрильних груп, які виникають в результаті розщеплення дисульфідних зв'язків. Як альтернатива, ферментативне розщеплення з використанням пепсину безпосередньо приводить до отримання двох одновалентних фрагментів Fab і фрагмента Fc. Ці методи описані, наприклад, в патенті США № 4331647, виданому Goldenberg; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; і в публікації Coligan на сторінках 2.8.1-2.8.10 і 2.10.-2.10.4.

У деяких варіантах здійснення використання фрагментів антитіл, позбавлених ділянки Fc, є переважним, щоб уникнути активації класичного шляху комплементу, який запускається при зв'язуванні Fc з рецептором Fcγ. Існують декілька способів, за допомогою яких можна отримувати моАт, що не бере участь у взаємодії з рецептором Fcγ. Наприклад, ділянку Fc моноклонального антитіла можна видаляти хімічним шляхом часткового розщеплення протеолітичними ферментами (наприклад, розщеплення фіцином), отримуючи при цьому, наприклад, антигензв'язувальні фрагменти антитіл, такі як фрагменти Fab або F(ab)₂ (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991). Альтернативно, людське IgG антитіло ізотипу γ4, яке не зв'язує рецептори Fcγ, можна використовувати при конструюванні гуманізованого антитіла, як описано в цьому документі. Антитіла, одноланцюжкові антитіла і антигензв'язувальні домени, позбавлені домену Fc, також можна конструювати з використанням рекомбінантних методів, описаних в цьому документі.

Одноланцюжкові фрагменти антитіл

Альтернативно, можна створювати зв'язуючі молекули з одного пептидного ланцюга, специфічні для MASP-2, в яких ділянки Fv важкого і легкого ланцюгів з'єднані. Фрагменти Fv можна зв'язувати пептидним лінкером, з отриманням одноланцюжкового антигензв'язувального білка (scFv). Ці одноланцюжкові антигензв'язувальні білки отримують шляхом конструювання структурного гена, що містить послідовності ДНК, які кодують домени VH і VL, зв'язані олігонуклеотидом. Структурний ген вставляють в експресійний вектор, який потім вводять в клітину-хазяїна, таку як E. coli. Рекомбінантні клітини-хазяї синтезують один поліпептидний ланцюг з пептидним лінкером, що з'єднує між собою V-домени. Методи отримання scFv описані, наприклад, в: Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; патенті США № 4946778, виданому Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993.

Як ілюстративний приклад MASP-2-специфічні scFv можна отримувати, піддаючи лімфоцити впливу поліпептиду MASP-2 in vitro і проводячи селекцію бібліотек фагового дисплея антитіл або аналогічних векторів (наприклад, шляхом використання іммобілізованого або міченого білка або пептиду MASP-2). Гени, що кодують поліпептиди, що мають потенційний зв'язуючий поліпептид MASP-2 домени, можна отримувати шляхом скринінгу випадкових пептидних бібліотек дисплею на фагу або бактерії, такий як E. coli. Ці випадкові бібліотеки пептидного дисплея можна використовувати для скринінгу на пептиди, які взаємодіють з MASP-2. Методи створення і скринінгу таких випадкових бібліотек пептидного дисплея добре відомі в даній галузі (патент США № 5223409, виданий Lardner; патент США № 4946778, виданий Ladner; патент США № 5403484, виданий Lardner; патент США № 5571698, виданий Lardner; і Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996), і випадкові бібліотеки пептидного дисплея, а також набори для скринінгу таких бібліотек, комерційно доступні, наприклад, від компаній CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) і Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Іншою формою анти-MASP-2 фрагмента антитіла, корисною в даному аспекті винаходу, є пептид, який відповідає одній ділянці, яка визначає комплементарність (CDR), який зв'язує епітоп на антигені MASP-2 і інгібує MASP-2-залежну активацію комплементу. Пептиди CDR ("мінімальні впізнавальні одиниці") можна отримувати шляхом конструювання генів, що кодують CDR цікавлячого антитіла. Такі гени отримують, наприклад, з використанням полімеразної ланцюгової реакції для синтезу варіабельної ділянки з РНК антитіла-продукуючих клітин (дивись, наприклад, 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.), page 166, Cambridge University Press, 1995; і Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", в: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Анти-MASP-2 антитіла, описані в цьому документі, вводять суб'єкту, який потребує цього,

для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібування MASP-2 засіб являє собою високоафінне людське або гуманізоване моноклональне анти-MASP-2 антитіло з редукованою ефекторною функцією.

Пептидні інгібітори

У деяких варіантах здійснення даного аспекту винаходу інгібування MASP-2 засіб включає виділені пептидні інгібітори MASP-2, включаючи виділені природні пептидні інгібітори і синтетичні пептидні інгібітори, які інгібують MASP-2-залежну систему активації комплементу. Використовуваний в цьому документі термін "виділені пептидні інгібітори MASP-2" означає пептиди, які інгібують MASP-2-залежну активацію комплементу шляхом зв'язування, конкуренції з MASP-2 за зв'язування, іншої молекули впізнавання (наприклад, MBL, Н-фіколіну, М-фіколіну або L-фіколіну) в лектиновому шляху, і/або шляхом прямої взаємодії з MASP-2, з інгібуванням MASP-2-залежної активації комплементу, і які є практично чистими і практично вільними від інших речовин, з якими вони можуть бути виявлені в природі, до такого ступеня, який є практичним і прийнятним для їх наміченого застосування.

Пептидні інгібітори були успішно використані *in vivo* для блокування білок-білкових взаємодій і каталітичних центрів. Наприклад, пептидні інгібітори молекул адгезії, структурно споріднені LFA-1, нещодавно були схвалені для клінічного застосування при коагулопатіях (Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50-55, 1995). Описані короткі лінійні пептиди (<30 амінокислот), які запобігають або перешкоджають інтегрин-залежній адгезії (Murayama, Про., et al., *J. Biochem.* 120:445-51, 1996). Більш довгі пептиди, що мають довжину в діапазоні від 25 до 200 амінокислотних залишків, також були успішно використані для блокування інтегрин-залежної адгезії (Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 271(47):29953-57, 1996). Як правило, більш довгі пептидні інгібітори мають більш високу афінність і/або більш низькі швидкості дисоціації, ніж короткі пептиди, і, таким чином, можуть бути більш сильними інгібіторами. Циклічні пептидні інгібітори, як показано, також є ефективними інгібіторами інтегринів *in vivo* для лікування запальних захворювань людини (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359-68, 1997). Один спосіб отримання циклічних пептидів включає синтез пептидів, в яких кінцеві амінокислоти пептиду являють собою залишки цистеїну, що дозволяє пептиду існувати в циклічній формі за рахунок утворення дисульфідних зв'язків між кінцевими амінокислотами, що, як показано, збільшує афінність і час напіввиведення *in vivo*, їх використовують для лікування гемопоетичних новоутворень (наприклад, патент США № 6649592, виданий Larson).

Синтетичні пептидні інгібітори MASP-2

Прикладами інгібування MASP-2 пептидів, корисних в способах за даним аспектом винаходу, є амінокислотні послідовності, які імітують ділянки-мішені, важливі для функції MASP-2. Інгібуючі пептиди, корисні при здійсненні на практиці способів за винаходом, мають розмір в діапазоні від приблизно 5 амінокислот до приблизно 300 амінокислот. У ТАБЛИЦІ 3 наведений список ілюстративних інгібування пептидів, які можуть бути використані при здійсненні на практиці даного аспекту даного винаходу. Потенційну інгібування MASP-2 пептид можна тестувати на наявність здатності діяти як інгібування MASP-2 засіб в одному з ряду аналізів, включаючи, наприклад, аналіз лектин-специфічного розщеплення C4 (описаний в прикладі 2) і аналіз відкладення C3b (описаний в прикладі 2).

У деяких варіантах здійснення інгібування MASP-2 пептиди є похідними від поліпептидів MASP-2 і вибрані з повнорозмірного зрілого білка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) або з конкретного домену білка MASP-2, такого як, наприклад, домен CUBI (SEQ ID NO: 8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), домен EGF (SEQ ID NO: 11) і домен серинової протеази (SEQ ID NO: 12). Як описано раніше, показано, що ділянки CUBEGFCUBII необхідні для димеризації і зв'язування з MBL (Thielens et al., вище). Зокрема, показано, що пептидна послідовність TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) в домені CUBI MASP-2 залучена до зв'язування з MBL в дослідженні, в якому була виявлена людина, що має гомозиготну мутацію Asp105 на Gly105, що приводить до втрати MASP-2 з комплексу з MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349:554-560, 2003).

У деяких варіантах здійснення інгібування MASP-2 пептиди є похідними від білків лектинів, які зв'язують MASP-2 і беруть участь в лектиновому шляху комплементу. Було ідентифіковано декілька різних лектинів, які беруть участь в цій шляху, включаючи манан-зв'язувальний лектин (MBL), L-фіколін, М-фіколін і Н-фіколін. (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). Ці лектини присутні в сироватці у вигляді олігомерів з гомотримерних субодиниць, кожна з яких має N-кінцеві колаген-подібні волокна з доменами впізнавання вуглеводу. Ці різні лектини, як було показано, зв'язують MASP-2, і комплекс лектин/MASP-2 активує комплемент шляхом розщеплення білків C4 і C2. Н-фіколін має аміно-кінцеву ділянку з 24 амінокислот, колаген-подібну домен з 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, горловинний домен з 12

амінокислот і фібриноген-подібний домен з 207 амінокислот (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Н-фіколін зв'язує GlcNAc і викликає аглютинацію людських еритроцитів, покритих LPS з *S. typhimurium*, *S. minnesota* і *E. coli*. Н-фіколін, як показано, зв'язаний з MASP-2 і MAr19 і активує лектиновий шлях (там же). L-фіколін/P35 також зв'язує GlcNAc і, як показано, зв'язаний з MASP-2 і MAr19 в людській сироватці, і показано, що цей комплекс активує лектиновий шлях (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). Відповідно, інгібуючі MASP-2 пептиди, корисні за даним винаходом, можуть містити область з щонайменше 5 амінокислот, вибрану з білка MBL (SEQ ID NO: 21), білка Н-фіколіну (реєстраційний номер Genbank NM_173452), білка М-фіколіну (реєстраційний номер Genbank O00602) і білка L-фіколіну (реєстраційний номер Genbank NM_015838).

Більш конкретно, вчені виявили, що MASP-2-зв'язувальний сайт на MBL знаходиться в межах 12 триплетів 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), які розташовуються між шарніром і горловинною частиною в С-кінцевій частині колаген-подібного домену MBP (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). Ця ділянка MASP-2-зв'язувального сайту також є високо консервативною в людському Н-фіколіні і людському L-фіколіні. Описаний консенсусний сайт зв'язування, присутній у всіх трьох білках лектинах, який містить амінокислотну послідовність "OGK-X-GP" (SEQ ID NO: 22), де буква "O" представляє гідроксипролін, і буква "X" представляє гідрофобний залишок (Wallis et al., 2004, вище). Відповідно, в деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 пептиди, корисні за даним аспектом винаходи, мають довжину щонайменше 6 амінокислот і містять SEQ ID NO: 22. Пептиди, похідні від MBL, які містять амінокислотну послідовність "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO: 24), як показано, зв'язують MASP-2 in vitro (Wallis, et al., 2004, вище). Для посилення зв'язування з MASP-2 можна синтезувати пептиди, які фланковані двома триплетами GPO на кожному кінці ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO: 25), для стимуляції утворення потрійних спіралей, які виявлені в природному білку MBL (як додатково описано в Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

Інгібуючі MASP-2 пептиди також можуть бути похідними від людського Н-фіколіну, який містить послідовність "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO: 27) з консенсусної MASP-2-зв'язувальної ділянки у Н-фіколіні. Також включені пептиди, похідні від людського L-фіколіну, які містять послідовність "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO: 28) з консенсусної MASP-2-зв'язувальної ділянки в L-фіколіні.

Інгібуючі MASP-2 пептиди також можуть бути похідними від сайту розщеплення C4, такого як "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO: 29), який являє собою сайт розщеплення C4, зв'язаний з С-кінцевою частиною антитромбіну III (Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

Таблиця 3:

ІЛЮСТРАТИВНІ ІНГІБУЮЧІ MASP-2 ПЕПТИДИ

SEQ ID NO	Джерело
SEQ ID NO: 6	Людський білок MASP-2
SEQ ID NO: 8	Домен CUBI в MASP-2 (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Домени CUBIEGF в MASP-2 (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Домени CUBIEGFCUBII в MASP-2 (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Домен EGF в MASP-2 (ак 122-166)
SEQ ID NO: 12	Домен серинової протеази в MASP-2 (ак 429-671)
SEQ ID NO: 16	MBL-зв'язувальна ділянка в MASP-2
SEQ ID NO: 3	Людський MAr19
SEQ ID NO: 21	Людський білок MBL
SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP, де "O" = гідроксипролін, і "X" являє собою гідрофобний амінокислотний залишок	Синтетичний пептид консенсусного сайту зв'язування з людського MBL і людських фіколінів
SEQ ID NO: 23 OGKLG	Центральний зв'язувальний сайт людського MBL
SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Триплети 6-10 людського MBP - демонструють зв'язування з MASP-2

ІЛЮСТРАТИВНІ ІНГІБУЮЧІ MASP-2 ПЕПТИДИ

SEQ ID NO	Джерело
SEQ ID NO: 25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOG GPOGPO	Триплети людського MBP з доданими GPO для стимуляції утворення потрібних спіралей
SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQ GPOGKLGPOGNOGPSGSOGPKG QKGDGKS	Триплети 1-17 людського MBP
SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEKGAOGPPQGPOGPOG KMGPKEOGDO	Людський H-фіколін (Hataka)
SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRG ERGPOGPOGKAGPOGPNGAOG E	Людський L-фіколін P35
SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Сайт розщеплення людського C4

Примітка: буква "O" представляє гідроксипролін. Буква "X" представляє гідрофобний залишок.

Пептиди, похідні від сайту розщеплення C4, а також інші пептиди, які інгібують сайт сериної протеази MASP-2, можуть бути хімічно модифіковані так, що вони стають необоротними інгібіторами протеази. Наприклад, відповідні модифікації можуть включати, але без обмеження, галометилкетони (Br, Cl, I, F) на C-кінці, Asp або Glu, або приєднані до функціональних бічних ланцюгів; галоацетильні (або інші α -галоацетильні) групи на аміногрупах або інших функціональних бічних ланцюгах; епоксидні або імін-вмісні групи на аміно- або карбоксильному кінцях, або на функціональних бічних ланцюгах; або складні імідатні ефіри на аміно- або карбоксильному кінцях, або на функціональних бічних ланцюгах. Такі модифікації забезпечили б перевагу постійного інгібування ферменту при ковалентному приєднанні пептиду. Це могло б дозволити знижувати ефективні дози і/або менш часто вводити пептидний інгібітор.

Крім інгібуючих пептидів, описаних вище, інгібуючі MASP-2 пептиди, корисні в способі за винаходом, включають пептиди, що містять MASP-2-зв'язувальну ділянку CDR3 з анти-MASP-2 моАт, отриманого, як описано в цьому документі. Послідовність областей CDR для використання в синтезі пептидів, можна визначати методами, відомими в даній галузі. Варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою пептид, який, як правило, має довжину в діапазоні від 100 до 150 амінокислот. Варіабельна ділянка легкого ланцюга являє собою пептид, який, як правило, має довжину в діапазоні від 80 до 130 амінокислот. Послідовності CDR в складі варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів містять послідовності довжиною лише приблизно 3-25 амінокислот, які можуть бути з легкістю секвензовані фахівцями в даній галузі.

Фахівці в даній галузі розуміють, що значною мірою гомологічні варіанти інгібуючих MASP-2 пептидів, описаних вище, також будуть виявляти MASP-2-інгібуючу активність. Ілюстративні варіанти включають, але не обов'язково обмежуються ними, пептиди, що мають вставки, делеції, заміни і/або додавання амінокислот на карбоксильній або аміно-кінцевій частинах конкретних пептидів і їх сумішей. Відповідно, вважається, що ці гомологічні пептиди, що мають MASP-2-інгібуючу активність, можуть бути використані в способах за даним винаходом. Описані пептиди також можуть містити дубльовані мотиви і інші модифікації з консервативними замінами. Консервативні варіанти описані в іншому розділі цього документа і мають заміни однієї амінокислоти на іншу з аналогічним зарядом, розміром або гідрофобністю, і тому подібним.

Інгібуючі MASP-2 пептиди можуть бути модифіковані для збільшення розчинності і/або для максимального збільшення позитивного або негативного заряду з метою більш точної імітації сегмента інтактного білка. Похідне може мати, або не мати, точну первинну амінокислотну структуру пептиду, розкритого в цьому документі, за умови, що похідне функціонально зберігає потрібну властивість інгібування MASP-2. Модифікації можуть включати амінокислотну заміну

однієї із загальновідомих двадцяти амінокислот або іншою амінокислотою, дериватизованою або заміщеною амінокислотою з додатковими бажаними характеристиками, такими як стійкість до розщеплення ферментами, або D-амінокислотою, або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглевод, яка імітує природну конформацію і функцію амінокислоти, амінокислот або пептиду; делецію амінокислоти; вставку амінокислоти, однієї із загальновідомих двадцяти амінокислот або іншої амінокислоти, дериватизованої або заміщеної амінокислоти з додатковими бажаними характеристиками, такими як стійкість до розщеплення ферментами, або D-амінокислоти, або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглевод, яка імітує природну конформацію і функцію амінокислоти, амінокислот або пептиду; або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглеводний або нуклеотидний мономер, який імітує природну конформацію, розподіл заряду і функцію вихідного пептиду. Пептиди також можуть бути модифіковані шляхом ацетилювання або амідування.

Синтез похідних інгібуючих пептидів можна здійснювати відомими методами біосинтезу пептидів, біосинтез вуглеводів і тому подібного. Як вихідну точку фахівець може використовувати відповідні програми для визначення конформації пептиду, який цікавить. Після встановлення конформації пептиду, розкритого в цьому документі, фахівець може визначати шляхом раціонального проектування який вигляд замінів можна виготовляти в одному або більше сайтах для отримання похідного, який зберігає основну конформацію і розподіл заряду вихідного пептиду, але може мати характеристики, відсутні у, або посилені відносно характеристик, вихідного пептиду. Після ідентифікації потенційних молекул похідних, похідні можна тестувати для визначення, чи діють вони як інгібуючі MASP-2 засоби, з використанням аналізів, описаних в цьому документі.

Скринінг на інгібуючі MASP-2 пептиди

Можна також використовувати молекулярне моделювання і раціональне молекулярне проектування для отримання і скринінгу пептидів, які імітують молекулярні структури ключових зв'язуючих ділянок MASP-2 і інгібують пов'язану з комплементом активність MASP-2. Молекулярні структури, що використовуються для моделювання, включають ділянки CDR анти-MASP-2 моноклональних антитіл, а також ділянки-мішені, які, як відомо, важливі для функції MASP-2, включаючи ділянку, необхідну для димеризації, ділянку, залучену до зв'язування з MBL, і активного центра серинової протеази, як описано раніше. Способи ідентифікації пептидів, які зв'язують конкретну мішень, добре відомі в даній галузі. Наприклад, можна використовувати молекулярний імпринтинг для de novo конструювання макромолекулярних структур, таких як пептиди, які зв'язують конкретну молекулу. Дивись, наприклад, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", TRIP 2(5) 1994.

Як ілюстративний приклад один з способів отримання міметиків MASP-2-зв'язувальних пептидів є наступним. Функціональні мономери відомого MASP-2-зв'язувального пептиду або зв'язуючої ділянки анти-MASP-2 антитіла, яке викликає інгібуння MASP-2 (матриця), полімеризують. Потім матрицю видаляють, з подальшою полімеризацією мономерів другого класу в ніші, залишеній після матриці, з отриманням нової молекули, яка має одну або більше з бажаних властивостей, аналогічних властивостям матриці. Крім отримання пептидів таким способом, також можна отримувати інші MASP-2-зв'язувальні молекули, які є інгібуючими MASP-2 засобами, такі як полісахариди, нуклеозиди, лікарські засоби, нуклеопротейди, ліпопротейни, вуглеводи, глікопротейни, стероїди, ліпіди і інші біологічно активні матеріали. Даний спосіб корисний для розробки найрізноманітніших біологічних міметиків, які є більш стабільними, ніж їх природні аналоги, оскільки вони, як правило, отримані шляхом вільнорадикальної полімеризації функціональних мономерів, що приводить до отримання сполуки з не біорозкладаним каркасом.

Пептидний синтез

Інгібуючі MASP-2 пептиди можна отримувати методами, добре відомими в даній галузі, такими як твердофазні методи синтезу, уперше описані в публікації Merrifield, в: J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963. Можна використовувати автоматизований синтез, наприклад, з використанням пептидного синтезатора Applied Biosystems 431A (Foster City, Calif.) відповідно до інструкцій виробника. Опис інших методів можна знайти, наприклад, в Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, друге видання, John Wiley & Sons, 1976, а також в інших літературних джерелах, відомих фахівцям в даній галузі.

Пептиди також можна отримувати з використанням стандартних методів генетичної інженерії, відомих фахівцям в даній галузі. Наприклад, пептид можна отримувати ферментативними методами шляхом вставки нуклеїнової кислоти, що кодує пептид, в експресійний вектор, який експресує ДНК, і трансляції ДНК в пептид в присутності необхідних

амінокислот. Потім пептид очищають з використанням хроматографічних або електрофоретичних методів, або за допомогою білка-носія, який може бути злитий, і згодом відщеплений від пептиду, шляхом вставки в експресійний вектор в фазі з кодуючою пептид послідовністю нуклеотидної послідовності, що кодує білок-носії. Зливу білок-пептид можна

5 виділяти з використанням хроматографічних, електрофоретичних або імунологічних методів (таких як зв'язування зі смолою через антитіло до білка-носія). Пептид можна відщеплювати з використанням хімічних або ферментативних методів, наприклад, за допомогою гідролас.

Інгібуючі MASP-2 пептиди, корисні в способі за винаходом, також можна отримувати в рекомбінантних клітинах-хазяїнах загальноприйнятими методами. Для експресії послідовності,

10 що кодує інгібуючий MASP-2 пептид, молекула нуклеїнової кислоти, що кодує пептид, повинна бути функціонально зв'язана з регуляторними послідовностями, які контролюють транскрипційну експресію, в експресійному векторі, а потім введена в клітину-хазяїна. Крім регуляторних послідовностей транскрипції, таких як промотори і енхансери, експресійні вектори можуть включати регуляторні послідовності трансляції і маркерний ген, який підходить для

15 селекції клітин, які несуть експресійний вектор.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують інгібуючий MASP-2 пептид, можна синтезувати за допомогою "генних машин" з використанням таких методів, як фосфорамідитний метод. Якщо хімічно синтезована дволанцюжкова ДНК необхідна для такого застосування, як синтез гена або генного фрагмента, то кожний комплементарний ланцюг виробляють окремо.

20 Отримання коротких генів (60-80 пар нуклеотидів) є технічно простою задачею, яка може бути виконана шляхом синтезу комплементарних ланцюгів, з їх подальшим відпалом. Для отримання більш довгих генів синтетичні гени (дволанцюжкові) збирають у вигляді модулів з одностанцюжкових фрагментів, що мають довжину від 20 до 100 нуклеотидів. Для огляду полінуклеотидного синтезу, дивись, наприклад, Glick and Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; i Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633, 1990.

25

Низькомолекулярні інгібітори

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 засоби являють собою низькомолекулярні інгібітори, включаючи природні і синтетичні речовини, які мають низьку молекулярну масу, такі

30 як, наприклад, пептиди, пептидоміметики і непептидні інгібітори (включаючи олігонуклеотиди і органічні сполуки). Низькомолекулярні інгібітори MASP-2 можна отримувати на основі молекулярної структури варіабельних ділянок анти-MASP-2 антитіл.

Низькомолекулярні інгібітори також можна проектувати і створювати на основі кристалічної структури MASP-2, використовуючи комп'ютерний дизайн лікарських засобів (Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992). Кристалічна структура щурячого MASP-2 описана (Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). З використанням способу, описаного Kuntz з співавторами, використовують координати кристалічної структури MASP-2 для введення в комп'ютерну програму, таку як DOCK, яка генерує список низькомолекулярних структур, які ймовірно будуть зв'язувати MASP-2. Використання таких комп'ютерних програм добре відоме фахівцям в даній

40 галузі. Наприклад, кристалічну структуру інгібітора протеази HIV-1 використовували для ідентифікації унікальних непептидних лігандів, які являють собою інгібітора протеази HIV-1, шляхом оцінки відповідності сполуки в базі кристалографічних даних Кембриджу зв'язувальному сайту ферменту з використанням програми DOCK (Kuntz, I.D., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).

Скринінг ряду низькомолекулярних структур, які були ідентифіковані комп'ютерним методом як потенційними інгібітори MASP-2, був проведений з використанням аналізу зв'язування MASP-2, такого як аналіз, описаний в прикладі 10. Малі молекули, які, як було встановлено, зв'язують MASP-2, потім були проаналізовані в функціональному аналізі, такому як аналіз, описаний в прикладі 2, для визначення того, чи інгібують вони MASP-2-залежну активацію комплексу.

45

Розчинні рецептори MASP-2

Інші прийнятні інгібуючі MASP-2 засоби, як вважають, включають розчинні рецептори MASP-2, які можуть бути отримані з використанням методів, відомих фахівцям в даній галузі.

Інгібітори експресії MASP-2

У іншому варіанті здійснення даного аспекту винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє собою інгібітор експресії MASP-2, здатний до інгібування MASP-2-залежної активації комплексу. При здійсненні на практиці даного аспекту винаходу репрезентативні інгібітори експресії MASP-2 включають антисмислові молекули нуклеїнової кислоти MASP-2 (такі як антисмислова мРНК, антисмислова ДНК або антисмислові олігонуклеотиди), рибозими MASP-2 і молекули РНКі MASP-2.

55

Антисмислові молекули РНК і ДНК діють, безпосередньо блокуючи трансляцію мРНК MASP-

60

2 за рахунок гібридизації з мРНК MASP-2 і запобігаючи трансляції білка MASP-2. Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти може бути сконструйована множиною різних способів за умови, що вона здатна перешкоджати експресії MASP-2. Наприклад, антисмислова молекула нуклеїнової кислоти може бути сконструйована шляхом інверсії кодувальної області (або її частини) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) відносно її нормальної орієнтації для транскрипції, з тим, щоб відбувалася транскрипція її комплементу.

Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти, як правило, практично ідентична щонайменше частині гена або генів мішені. Однак нуклеїнова кислота не обов'язково повинна бути абсолютна ідентична для інгібування експресії. Як правило, можна використовувати більш високий ступінь гомології для компенсації використання більш короткої антисмислової молекули нуклеїнової кислоти. Мінімальний процент ідентичності, як правило, перевищує приблизно 65 %, однак більш високий процент ідентичності може приводити до більш ефективної репресії експресії ендогенної послідовності. Загалом, процент ідентичності, що перевищує приблизно 80 %, як правило, є переважним, хоча ступінь від приблизно 95 % до абсолютного, як правило, є найбільш переважний.

Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти не обов'язково повинна мати точно такий же патерн інтронів або екзонів, як ген-мішень, і не кодує сегменти гена-мішені можуть бути однаково ефективними для досягнення антисмислового придушення експресії гена-мішені, як і кодує сегменти. Послідовність ДНК довжиною щонайменше приблизно 8, або близько того, нуклеотидів можна використовувати як антисмислову молекулу нуклеїнової кислоти, хоча переважною є більш довга послідовність. За даним винаходом репрезентативним прикладом корисного інгібуючого засобу для MASP-2 є антисмислова молекула нуклеїнової кислоти MASP-2, яка щонайменше на дев'яносто відсотків ідентична комплементу кДНК MASP-2, що складається з нуклеотидної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 4. Нуклеотидна послідовність, наведена в SEQ ID NO: 4, кодує білок MASP-2, що складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 5.

Націлення антисмислових олігонуклеотидів для зв'язування мРНК MASP-2 є іншим механізмом, який можна використовувати для зниження рівня синтезу білка MASP-2. Наприклад, синтез полігалактуронази і ацетилхолінового рецептора мускаринового типу 2 інгібуються антисмисловими олігонуклеотидами, направленими на їх відповідні послідовності мРНК (патент США № 5739119, виданий Cheng, і патент США № 5759829, виданий Shewmaker). Крім того, приклади антисмислового інгібування були продемонстровані для ядерного білка цикліну, гена множинної лікарської стійкості (MDG1), ICAM-1, Е-селектину, STK-1, стріарних GABAA рецепторів і людського EGF (дивись, наприклад, патент США № 5801154, виданий Baracchini; патент США № 5789573, виданий Baker; патент США № 5718709, виданий Considine і патент США № 5610288, виданий Reubenstein).

Описана система, що дозволяє фахівцям в даній галузі визначати, які олігонуклеотиди можуть бути використані за винаходом, що включає дослідження відповідних сайтів в мРНК-мішені шляхом розщеплення РНКазою Н як показника доступності послідовності в транскриптах. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res.* 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res.* 29:3665-3673, 2001. Суміш антисмислових олігонуклеотидів, комплементарних певним ділянкам транскрипта MASP-2, додають до екстрактів клітин, які експресують MASP-2, таких як гепатоцити, і проводять гібридизацію для створення вразливого для РНКазою Н сайту. Цей метод можна об'єднувати з вибором послідовності за допомогою комп'ютерної програми, яка може передбачати оптимальний вибір послідовності для антисмислових композицій на основі їх відносної здатності до утворення димерів, шпильок або інших вторинних структур, які привели б до зменшення або усунення специфічного зв'язування з мРНК-мішенню в клітині-хазяїні. Цей аналіз вторинної структури і вибір сайту-мішені можна виконувати з використанням програми аналізу оліго праймерів (Rychlik, I., 1997) і програми (алгоритму) BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1997). Антисмислові сполуки, направлені на послідовність-мішень, переважно мають довжину від приблизно 8 до приблизно 50 нуклеотидів. Особливо переважними є антисмислові олігонуклеотиди, що містять від приблизно 9 до приблизно 35, або близько того, нуклеотидів. Автори винаходу очікують, що всі олігонуклеотидні композиції з довжиною в діапазоні від 9 до 35 нуклеотидів (тобто, довжиною 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, або 35, або близько того, нуклеотидів) є особливо переважними при здійсненні на практиці основаних на антисмислових олігонуклеотидах способів за винаходом. Особливо переважними областями-мішенями в мРНК MASP-2 є ті, які знаходяться в ділянці, або поруч з ділянкою, кодона ініціації трансляції AUG, і ті послідовності, які є значною мірою комплементарними 5'-ділянкам мРНК, наприклад, ділянкам від -10 до +10 в нуклеотидній послідовності гена MASP-2 (SEQ ID NO: 4). Ілюстративні інгібітори

експресії MASP-2 наведені в ТАБЛИЦІ 4.

Таблиця 4:

ІЛЮСТРАТИВНІ ІНГІБІТОРИ ЕКСПРЕСІЇ MASP-2

SEQ ID NO: 30 (нуклеотиди 22-680 в SEQ ID NO: 4)	Нуклеотидна послідовність «ДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4), яка кодує CUBIEGF
SEQ ID NO: 31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3	Нуклеотиди 12-45 в SEQ ID NO: 4, включаючи сайт начала трансляції MASP-2 (смислова)
SEQ ID NO: 32 5'GACATTACSTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	Нуклеотиди 361-396 в SEQ ID NO: 4, які кодують ділянку, яка містить сайт зв'язування MBL MASP-2 (смислова)
SEQ ID NO: 33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCAAA3'	Нуклеотиди 610-642 в SEQ ID NO: 4, які кодують ділянку, яка містить домен CUBII

Як відзначено вище, використовуваний в цьому документі термін "олігонуклеотид" означає олігомер або полімер рибонуклеїнової кислоти (РНК) або дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), або їх міметики. Цей термін також охоплює олігонуклеотиди, що складаються з природних нуклеотидів, залишків цукру і ковалентних міжнуклеозидних (каркасних) зв'язків, а також олігонуклеотиди, що мають неприродні модифікації. Такі модифікації дозволяють додавати певних бажаних властивостей, які відсутні у природних олігонуклеотидів, наприклад, знижені токсичні властивості, підвищену стабільність проти розщеплення нуклеазами і підвищене поглинання клітиною. У ілюстративних варіантах здійснення антисмислові сполуки за винаходом відрізняються від природної ДНК за рахунок модифікацій фосфодіефірних зв'язків каркаса, в яких фосфатні замісники замінені на фосфоротіоати для продовження існування антисмислового олігонуклеотиду. Аналогічно, один або більше кінців олігонуклеотиду можуть бути заміщені одним або більше акридиновими похідними, які вбудовуються між сусідніми парами нуклеотидів в ланцюгу нуклеїнової кислоти.

Іншою альтернативою антисмислової послідовності є використання "РНК інтерференції (РНКі)". Дволанцюжкові РНК (длРНК) можуть приводити до вимкнення гена у ссавців *in vivo*. Природна функція РНКі і косупресії, судячи з усього, полягає в захисті генома від проникнення мобільних генетичних елементів, таких як ретротранспозони і віруси, які продукують аберантну РНК або длРНК в клітині-хазяїні, коли вони стають активними (дивись, наприклад, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999). Дволанцюжкову молекулу РНК можна отримувати шляхом синтезу двох ланцюгів РНК, здатних до утворення дволанцюжкової молекули РНК, кожна з яких має довжину приблизно 19-25 (наприклад, 19-23) нуклеотидів. Наприклад, молекула длРНК, корисна в способах за винаходом, може включати РНК, відповідну послідовності і її комплементу, які наведені в ТАБЛИЦІ 4. Переважно, щонайменше один ланцюг РНК має "липкий" 3'-кінець з 1-5 нуклеотидів. Синтезовані ланцюги РНК об'єднують в умовах, що приводять до утворення дволанцюжкової молекули. Послідовність РНК може містити частину SEQ ID NO: 4 з щонайменше 8 нуклеотидів, із загальною довжиною, що становить 25 нуклеотидів або менше. Конструювання послідовностей кіРНК для конкретної мішені знаходиться в межах компетенції фахівця в даній галузі. Доступні комерційні послуги по конструюванню послідовності кіРНК, з гарантією щонайменше 70 % нокдауну експресії (Qiagen, Valencia, Calif).

длРНК можна вводити у вигляді фармацевтичної композиції відомими методами, при цьому нуклеїнову кислоту вводять в потрібну клітину-мішень. Загальноприйняті методи перенесення генів включають методи з фосфатом кальцію, DEAE-декстраном, електропорацію, мікроін'єкцію і використання вірусів. Такі методи описані в збірнику Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Рибозими також можна використовувати для зниження кількості і/або біологічної активності MASP-2, наприклад, рибозими, які націлені на мРНК MASP-2. Рибозими являють собою каталітичні молекули РНК, здатні розщеплювати молекули нуклеїнової кислоти, що мають послідовність, яка повністю або частково гомологічна послідовності рибозиму. Можна конструювати трансгени рибозимів, що кодують РНК рибозими, які специфічно спарюються з РНК-мішенню і розщеплюють фосфодіефірний каркас в певній ділянці, тим самим функціонально інактивуючи РНК-мішень. При здійсненні цього розщеплення сам рибозим не

змінюється і, таким чином, здатний до рециркуляції і розщеплення інших молекул. Включення послідовностей рибозима в антисмислові РНК додає останнім РНК-розщеплювальної активності, тим самим підвищуючи активність антисмислових конструктів.

Рибозими, корисні при здійсненні на практиці винаходу, як правило, містять ділянку, яка гібридується, зі щонайменше приблизно дев'яти нуклеотидів, яка комплементарна нуклеотидній послідовності щонайменше частини мРНК MASP-2, і каталітичну ділянку, яка пристосована для розщеплення мРНК-мішені MASP-2 (дивись в основному, EPA № 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., *Nature* 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., *Ann. Rev. Biochem.* 55:599-629, 1986).

Рибозими можуть бути або направлені безпосередньо до клітин в формі РНК олігонуклеотидів, що містять послідовності рибозима, або введені в клітину у вигляді експресійного вектора, що кодує потрібну РНК рибозима. Рибозими можна використовувати і застосовувати практично так само, як описано для антисмислових поліонуклеотидів.

Антисмислові РНК і ДНК, рибозими і молекули РНКі, корисні в способах за винаходом, можна отримувати будь-яким способом, відомим в даній галузі для синтезу молекул ДНК і РНК. Сюди входять методи хімічного синтезу олігодезоксирибонуклеотидів і олігорибонуклеотидів, добре відомі в даній галузі, такі як, наприклад, твердофазний фосфорамідитний хімічний синтез. Альтернативно, молекули РНК можна отримувати шляхом *in vitro* і *in vivo* транскрипції послідовностей ДНК, що кодують антисмислову молекулу РНК. Такі послідовності ДНК можна включати в найрізноманітніші вектори, що містять відповідні промотори РНК-полімерази, такі як промотори полімерази T7 або SP6. Альтернативно, антисмислові конструкти кДНК, які синтезують антисмислову РНК конститутивно або індукуються, залежно від використовуваного промотору, можна стабільно вводити в лінійні клітини.

Різні добре відомі модифікації молекул ДНК можна вводити як засіб для підвищення стабільності і періоду напіввиведення. Корисні модифікації включають, але без обмеження, додавання фланкуючих послідовностей з рибонуклеотидів або дезоксирибонуклеотидів на 5' і/або 3'-кінцях молекули, або використання фосфоротіоату або 2'-О-метилу замість фосфодіефірних зв'язків в олігодезоксирибонуклеотидному каркасі.

VI. Фармацевтичні композиції і способи доставки

У іншому аспекті винахід стосується композицій для інгібування несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплексу у суб'єкта, який страждає на захворювання або стану, розкритого в цьому документі, шляхом введення суб'єкту композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 засобу і фармацевтично прийняттого носія. Інгібуючі MASP-2 засоби можна вводити суб'єкту, який потребує цього, в терапевтично ефективних дозах для лікування або полегшення станів, пов'язаних з MASP-2-залежною активацією комплексу. Терапевтично ефективна доза означає кількість інгібуючого MASP-2 засобу, достатню для ослаблення симптомів, пов'язаних із захворюванням або станом.

Токсичність і терапевтичну ефективність інгібуючих MASP-2 засобів можна визначати стандартними фармацевтичними методами з використанням експериментальних тваринних моделей, таких як модель на мишах MASP-2^{-/-}, які експресують людський трансген MASP-2, яка описано в прикладі 1. З використанням таких тваринних моделей можна визначати NOAEL (дозу, що не викликає небажаних ефектів, що спостерігаються) і MED (мінімальну ефективну дозу) стандартними методами. Відношення доз між ефектами NOAEL і MED являє собою терапевтичний індекс, який виражають у вигляді відношення NOAEL/MED. Інгібуючі MASP-2 засоби, що мають великі терапевтичні індекси, або коефіцієнти, є найбільш переважними. Дані, отримані в аналізі на клітинних культурах і в дослідженнях на тваринах, можна використовувати для визначення доз, що застосовуються для людини. Доза інгібуючого MASP-2 засобу переважно лежить в діапазоні циркулюючих концентрацій, що включають MED з невеликою токсичністю, або без неї. Дози можуть варіюватися в межах даного діапазону, залежно від використовуваної лікарської форми і використовуваного шляху введення.

Для будь-якого препарату сполуки терапевтично ефективну дозу можна оцінювати з використанням тваринних моделей. Наприклад, дозу можна формулювати в тваринній моделі для досягнення діапазону циркулюючих концентрацій в плазмі, який включає MED. Кількісні рівні інгібуючого MASP-2 засобу в плазмі також можна вимірювати, наприклад, методом високоефективної рідинної хроматографії.

Крім досліджень токсичності ефективну дозу також можна оцінювати на основі кількості білка MASP-2, присутньої у живого суб'єкта, і афінності зв'язування інгібуючого MASP-2 засобу. Показано, що рівні MASP-2 у нормальних суб'єктів-людей в сироватці є низькими, в межах 500 нг/мл, і рівні MASP-2 у конкретного суб'єкта можна визначати з використанням кількісного аналізу на MASP-2, описаного в публікації Moller-Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods*

282:159-167, 2003.

Як правило, доза введених композицій, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, варіюється залежно від таких факторів, як вік, маса тіла, зріст, стать, загальний стан здоров'я і попередня історія хвороб суб'єкта. Як ілюстрація, інгібуючі MASP-2 засоби, таких як анти-MASP-2 антитіла, можна вводити в діапазонах доз приблизно 0,010-10,0 мг/кг, переважно 0,010-1,0 мг/кг, більш переважно 0,010-0,1 мг/кг маси тіла суб'єкта. У деяких варіантах здійснення композиція містить поєднання анти-MASP-2 антитіл і інгібуючих MASP-2 пептидів.

Терапевтичну ефективність інгібуючих MASP-2 композицій і способів за даним винаходом у конкретного суб'єкта, і відповідні дози, можна визначати в аналізах комплементу, добре відомих фахівцям в даній галузі. Активація комплементу приводить до утворення множини специфічних продуктів. Протягом останнього десятиріччя були розроблені чутливі і специфічні аналізи, які комерційно доступні для більшості цих продуктів активації, включаючи малі фрагменти активації C3a, C4a, і C5a, а також великі фрагменти активації iC3b, C4d, Bb і sC5b-9. У більшості з цих аналізів використовують моноклональні антитіла, які реагують з новими антигенами (неоантигенами), експонованими на фрагменті, але не на нативних білках, з яких вони утворюються, що робить ці аналізи дуже простими і специфічними. У більшості з них використовують технологію ELISA, хоча іноді всі ще використовують радіоімунний аналіз для C3a і C5a. У цих останніх аналізах визначають як не процесовані фрагменти, так і їх "дезArg" фрагменти, які являють собою основні форми, що зустрічаються в системі кровообігу. Не процесовані фрагменти і C5a_{дезArg} швидко виводяться за рахунок зв'язування з клітинними поверхневими рецепторами і, внаслідок цього, присутні в дуже низьких концентраціях, в той час як C3a_{дезArg} не зв'язується з клітинами і накопичується в плазмі. Вимірювання рівня C3a являє собою чутливий незалежний від шляху показник активації комплементу. Активацію альтернативного шляху можна оцінювати шляхом визначення фрагмента Bb. Визначення рідкофазного продукту атаки мембран внаслідок шляху активації, sC5b-9, є доказом того, що комплемент активується до завершення. Оскільки як в лектиновому, так і в класичному, шляхах утворюються однакові продукти активації, C4a і C4d, визначення цих двох фрагментів не дозволяє встановлювати, який з цих двох шляхів привів до утворення продуктів активації.

Інгібування MASP-2-залежної активації комплементу характеризується щонайменше однією з наступних змін в компонентах системи комплементу, які відбуваються внаслідок введення інгібуючого MASP-2 засобу відповідно до способів за винаходом: інгібування утворення або продукування продуктів MASP-2-залежної активації комплементу, C4b, C3a, C5a і/або C5b-9 (MAC) (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 2), зменшення розщеплення C4 і відкладення C4b (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 10) або зменшення розщеплення C3 і відкладення C3b (що вимірюється, наприклад, як описано в прикладі 10).

Додаткові засоби

Композиції і способи, що включають інгібуючі MASP-2 засоби, можуть, необов'язково, включати одне або більше додаткових лікарських засобів, які можуть підвищувати активність інгібуючого MASP-2 засобу або які виконують пов'язані терапевтичні функції адитивним або синергетичним чином. Наприклад, в контексті лікування суб'єкта, який страждає на ТТП, коли суб'єкт має позитивний результат аналізу на інгібітор ADAM-TS13, один або більше інгібуючих MASP-2 засобів можна вводити в поєднанні (включаючи спільне введення) з одним або більше імунодепресантами. Прийнятні імунодепресанти включають: кортикостероїди, ритуксан, циклоспорин і тому подібне. У контексті лікування суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, HUS або aHUS, один або більше інгібуючих MASP-2 засобів можна вводити в поєднанні (включаючи спільне введення) з відповідним антибіотиком. У контексті лікування суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, aHUS, один або більше інгібуючих MASP-2 засобів можна вводити в поєднанні (включаючи спільне введення) з іншими інгібуючими комплемент засобами, такими як екулізумаб (солірис), ТТ-30, антитіло до фактора В, або інші засоби, які інгібують термінальні компоненти комплементу або ампліфікацію альтернативного шляху.

Включення і вибір додаткового засобу(засобів) буде залежати від бажаного терапевтичного результату. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 засіб можна вводити в поєднанні з одним або більше протизапальними і/або анальгетичними засобами. Прийнятні протизапальні і/або анальгетичні засоби включають: антагоністи серотонінових рецепторів; агоністи серотонінових рецепторів; антагоністи гістамінових рецепторів; антагоністи брадікінінових рецепторів; інгібітори калікреїну; антагоністи тахікінінових рецепторів, включаючи антагоністи підтипів рецепторів нейрокініну1 і нейрокініну2; антагоністи рецепторів пептиду, пов'язаного з геном кальцитоніну (CGRP); антагоністи інтерлейкінових рецепторів; інгібітори ферментів, активних в шляхах синтезу метаболітів арахідонової кислоти, включаючи інгібітори

фосфоліпази, в тому числі інгібітори ізоформи PLA₂ і інгібітори ізоформи PLC_γ, інгібітори циклооксигенази (COX) (які можуть являти собою інгібітори або COX-1, COX-2, або невибіркові інгібітори COX-1 і -2), інгібітори ліпооксигенази; антагоністи простаноїдних рецепторів, включаючи антагоністи підтипів рецепторів ейкозаноїдів EP-1 і EP-4 і антагоністи підтипів рецепторів тромбоксану; антагоністи лейкотриєнових рецепторів, включаючи антагоністи підтипів рецепторів лейкотриєну B₄ і антагоністи підтипів рецепторів лейкотриєну D₄; агоністи опіоїдних рецепторів, включаючи агоністи підтипів рецепторів μ-опіоїдів, δ-опіоїдів і κ-опіоїдів; агоністи і антагоністи пуринергічних рецепторів, включаючи антагоністи рецепторів P_{2x} і агоністи рецепторів P_{2y}; активатори аденозинтрифосфат (АТФ)-залежних калієвих каналів; інгібітори MAP-кінази; інгібітори нікотинових ацетилхолінових рецепторів і агоністи альфа-адренергічних рецепторів (включаючи агоністи альфа-1, альфа-2, а також невибіркові агоністи альфа-1 і 2 рецепторів).

Інгібуючі MASP-2 засоби за даним винаходом також можна вводити в поєднанні з одним або більше іншими інгібіторами комплементу, такими як інгібітор C5. У цей час екулізумаб (солірис®), антитіло проти C5, є єдиним спрямованим на комплемент лікарським засобом, який був схвалений для лікування людей. Однак деякі фармакологічні засоби, як показано, блокують комплемент *in vivo*. K76COOH і нафамостат мезилат являють собою два засоби, які, як показано, мають деяку ефективність в тваринних моделях трансплантації (Miyagawa, S., et al., Transplant Proc. 24:483-484, 1992). Низькомолекулярні гепарини також, як показано, є ефективними в регуляції активності комплементу (Edens, R.E., et al., Complement Today, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). Вважається, що ці низькомолекулярні інгібітори можуть бути корисними як засоби, що використовуються в поєднанні з інгібуючими MASP-2 засобами за даним винаходом.

Інші природні інгібітори комплементу можуть бути використані в поєднанні з інгібуючими MASP-2 засобами за даним винаходом. Біологічні інгібітори комплементу включають розчинний фактор комплементу 1 (sCR1). Він являє собою природний інгібітор, який присутній на зовнішніх мембранах людських клітин. Інші мембранні інгібітори включають DAF, MCP і CD59. Рекombінантні форми були протестовані на їх активність проти комплементу *in vitro* і *in vivo*. Показано, що sCR1 є ефективним при ксенотрансплантації, коли система комплементу (як альтернативна, так і класична) створює тригер для синдрому гіперактивного відторгання в межах декількох хвилин після перфузії крові через щойно трансплантований орган (Platt, J.L., et al., Immunol. Today 11:450-6, 1990; Marino, I.R., et al., Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., Transplantation 54:573-6, 1992). Використання sCR1 забезпечує захист і продовжує термін виживання трансплантованого органу, вказуючи на участь шляхи комплементу в патогенезі відторгнення органу (Leventhal, J.R., et al., Transplantation 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., Transplantation 57:363-70, 1994).

Прийнятні додаткові інгібітори комплементу для використання в поєднанні з композиціями за даним винаходом також включають, як приклад, моАт, такі як анти-C5 антитіло (наприклад, екулізумаб), що розробляється Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, і моАт проти пропердину.

Фармацевтичні носії і середовища для доставки

Як правило, композиції інгібуючого MASP-2 засобу за даним винаходом, в поєднанні з будь-якими іншими вибраними терапевтичними засобами, містяться в фармацевтично прийнятному носії. Носій є нетоксичним, біосумісним і вибраним таким чином, щоб не впливати негативним чином на біологічну активність інгібуючого MASP-2 засобу (і будь-яких інших терапевтичних засобів, об'єднаних з ним). Ілюстративні фармацевтично прийнятні носії для пептидів описані в патенті США № 5211657, виданому Yamada. Анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди, корисні за винаходом, можуть бути сформульовані в препарати в твердій, напівтвердій, гелевій, рідкій або газоподібній формах, таких як таблетки, капсули, порошки, гранули, мазі, розчини, депо, інгаляційні і ін'єкційні препарати, що використовуються для перорального, парентерального або хірургічного введення. За винаходом також передбачене локальне введення композицій шляхом нанесення на медичні пристрої і тому подібне.

Прийнятні носії для парентеральної доставки шляхом ін'єкції, інфузії або зрошування, а також топічної доставки, включають дистильовану воду, фізіологічний фосфатно-сольовий буфер, нормальний розчин Рінгера або розчин Рінгера лактат, розчин декстрази, розчин Хенка або пропандіол. Крім того, як розчинник або суспензійне середовище можна використовувати стерильні нелеткі масла. Для цієї мети можна використовувати будь-яке біосумісне масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, у виготовленні ін'єкційних препаратів використовують жирні кислоти, такі як олеїнова кислота. Носій і засіб можна формувати у вигляді рідини, суспензії, полімеризованого або не полімеризованого гелю, пасти або мазі.

Носій також може включати середовище для доставки, призначене для підтримки (тобто, продовження, відстрочки або регуляції) доставки засобу(засобів) або для поліпшення доставки, поглинання, стабільності або фармакокінетики терапевтичного засобу(засобів). Такі середовища для доставки можуть включати, як необмежувальний приклад, мікрочастинки, мікросфери, наносфери або наночастинки, що складаються з білків, ліпосом, вуглеводів, синтетичних органічних сполук, неорганічних сполук, полімерних або співполімерних гідрогелів і полімерних міцел. Прийнятні гідрогелі і міцелярні системи доставки включають співполімери PEO:PHB:PEO і співполімери/циклодекстринові комплекси, розкриті в WO 2004/009664 A2, а також PEO і PEO/циклодекстринові комплекси, розкриті в публікації патентної заявки США № 2002/0019369 A1. Такі гідрогелі можна вводити ін'єкцією локально в ділянку запланованої дії або підшкірно, або внутрішньом'язово, з метою формування депо для уповільненого вивільнення.

Для внутрішньосуглобової доставки інгібуючий MASP-2 засіб може знаходитися у вищеописаних рідких або гелевих носіях, які можна вводити ін'єкцією, вищеописаних середях для доставки з уповільненим вивільненням, які можна вводити ін'єкцією, або в гіалуронової кислоти або похідному гіалуронової кислоти.

Для перорального введення не пептидергічних засобів інгібуючий MASP-2 засіб може знаходитися в інертному наповнювачі або розріджувачі, такому як сахароза, кукурудзяний крохмаль або целюлоза.

Для топічного введення інгібуючий MASP-2 засіб може знаходитися в мазі, лосьйоні, кремі, гелі, краплях, супозиторії, аерозолі, рідині або порошку, або в гелевих або мікрокапсульних системах доставки з використанням черезшкірного пластиру.

Різні назальні і легеневі системи доставки, включаючи аерозолі, що дозують інгалятори, інгалятори сухого порошку і небулайзери, розроблені і можуть бути успішно пристосовані для доставки препарату за даним винаходом в аерозольному, інгаляційному або розпилюваному середовищі для доставки, відповідно.

Для інтратекальної (і/т) або інтрацеребровентрикулярної (і/цв) доставки препарату за даним винаходом можна використовувати відповідні стерильні системи доставки (наприклад, рідини; гелі, суспензії і так далі).

Композиції за даним винаходом також можуть включати біосумісні ексципієнти, такі як диспергуючі або зволожувальні засоби, суспендуючі засоби, розріджувачі, буфери, підсилювачі проникнення, емульгатори, зв'язувальні речовини, загусники, смакові добавки (для перорального введення).

Фармацевтичні носії для антитіл і пептидів

Більш конкретно, у випадку анти-MASP-2 антитіл і інгібуючих пептидів ілюстративні препарати можна вводити парентерально у вигляді ін'єкційних доз розчину або суспензії сполуки в фізіологічно прийнятному розріджувачі з фармацевтичним носієм, який може являти собою стерильну рідину, таку як вода, масла, сольовий розчин, гліцерин або етанол. Крім того, в композиціях, що містять анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди, можуть бути присутніми допоміжні речовини, такі як зволожувач або емульгатори, сурфактанти, регулюючі pH речовини і тому подібне. Додаткові компоненти фармацевтичних композицій включають масла (наприклад, тваринного, рослинного або синтетичного походження), наприклад, соєву олію і мінеральне масло. Як правило, гліколі, такі як пропіленгліколь або поліетиленгліколь, є переважними рідкими носіями для ін'єкційних розчинів.

Анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди також можна вводити в формі ін'єкційного або імплантованого депо-препарату, який може бути сформульований так, щоб забезпечувати уповільнене або імпульсне вивільнення активних засобів.

Фармацевтично прийнятні носії для інгібіторів експресії

Більш конкретно, у випадку інгібіторів експресії, корисних в способах за винаходом, запропоновані композиції, які містять інгібітор експресії, описаний вище, і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач. Композиція може додатково містити колоїдну дисперсійну систему.

Фармацевтичні композиції, що містять інгібітори експресії, можуть включати, але без обмеження, розчини, емульсії і препарати, які містять ліпосоми. Ці композиції можна створювати з різних компонентів, які включають, але без обмеження, готові рідини, самоемульговані тверді речовини і самоемульговані напівтверді речовини. Виготовлення таких композицій, як правило, включає об'єднання інгібітора експресії з одним або більше з наступного: буфери, антиоксиданти, низькомолекулярні поліпептиди, білки, амінокислоти, вуглеводи, включаючи глюкозу, сахарозу або декстрини, хелатуючі агенти, такі як ЕДТА, глутатіон і інші стабілізатори і ексципієнти. Нейтральний буферний сольовий розчин або сольовий розчин, змішаний з неспецифічним сироватковим альбуміном, є прикладами

прийнятних розріджувачів.

У деяких варіантах здійснення композиції можна готувати і формулювати у вигляді емульсій, які, як правило, являють собою гетерогенні системи з однієї рідини, диспергованої в іншій рідині у вигляді крапель (дивись, Idson, в: *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger і Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Приклади природних емульгаторів, що використовуються в

емульсійних препаратах, включають гуміарабік, бджолиний віск, ланолін, лецитин і фосфатиди. У одному варіанті здійснення композиції, що містять нуклеїнові кислоти, можуть бути сформульовані у вигляді мікроемульсій. Використовуваний в цьому документі термін "мікроемульсія" означає систему з води, масла і амфіфільної речовини, яка являє собою один оптично ізотропний і термодинамічно стабільний рідкий розчин (дивись Rosoff в: *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1). У способі за винаходом також можна використовувати ліпосоми для перенесення і доставки антисмислових олігонуклеотидів в потрібну ділянку.

Фармацевтичні композиції і препарати інгібіторів експресії для топічного введення можуть включати черезшкірні пластири, мазі, лосьйони, креми, гелі, краплі, супозиторії, спреї, рідини і порошки. Можна використовувати загальноприйнятні фармацевтичні носії, а також водні, порошкові або масляні бази, загусники і тому подібне.

Способи введення

Фармацевтичні композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити різними способами залежно від того, чи є найбільш прийнятними для стану, що піддається лікуванню, локальний або системний спосіб введення. Крім того, як описано вище в цьому документі, у випадку процедур екстракорпоральної реперфузії інгібуючі MASP-2 засоби можна вводити шляхом введення композицій за даним винаходом в кров або плазму, що проходить через систему рециркуляції. Крім того, композиції за даним винаходом можна доставляти шляхом нанесення, або включення, композицій на, або в, медичний пристрій, що імплантується.

Системна доставка

Використовувані в цьому документі терміни "системна доставка" і "системне введення" повинні включати, але не обмежуватися ними, пероральний і парентеральний шляхи введення, включаючи внутрішньом'язовий (в/м), підшкірний, внутрішньовенний (в/в), внутрішньоартеріальний, інгаляційний, під'язиковий, трансбукальний, топічний, черезшкірний, назальний, ректальний, вагінальний і інші шляхи введення, які ефективно приводять до диспергування засобу, що доставляється, в одній або декількох ділянках запланованої терапевтичної дії. Терапевтичні шляхи системної доставки для даних композицій включають внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний і інгаляційний. Потрібно розуміти, що точний шлях системного введення для конкретних засобів, що використовуються в конкретних композиціях за даним винаходом, буде залежати частково від підданості засобу метаболічним шляхам трансформації, пов'язаним з конкретним шляхом введення. Наприклад, пептидергічні засоби найбільш переважно вводити іншими шляхами, ніж пероральний шлях введення.

Інгібуючі MASP-2 антитіла і поліпептиди можна доставляти суб'єкту, який потребує цього, будь-якими прийнятними способами. Способи доставки анти-MASP-2 антитіл і поліпептидів включають введення пероральним, легеневим, парентеральним (наприклад, внутрішньом'язовою, внутрішньоочеревинною, внутрішньовенною (в/в) або підшкірною ін'єкцією), інгаляційним (наприклад, у вигляді препарату тонкодисперсного порошку), черезшкірним, назальним, вагінальним, ректальним або під'язиковим шляхами введення, і вони можуть бути сформульовані в лікарських формах, прийнятних для кожного шляху введення.

Як репрезентативного приклад інгібуючі MASP-2 антитіла і пептиди можна вводити в живий організм шляхом нанесення на тілесні оболонки, здатні абсорбувати поліпептиди, наприклад, оболонки носової порожнини, шлунково-кишкового тракту і прямої кишки. Поліпептиди, як правило, наносять на абсорбуючу оболонку в поєднанні з підсилювачем проникнення. (Дивись, наприклад, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, 1988; Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release* 13:241, 1990.) Наприклад, STDHF являє собою синтетичне похідне фусидової кислоти, стероїдний сурфактант, який аналогічний по структурі солям жовчних кислот, і його використовують як підсилювач проникнення для назальної доставки (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dec. 1990).

Інгібуючі MASP-2 антитіла і поліпептиди можна вводити в поєднанні з іншою молекулою, такою як ліпід, для захисту поліпептидів від ферментативного розщеплення. Наприклад, ковалентне приєднання полімерів, зокрема, поліетиленгліколю (ПЕГ), було використано для захисту певних білків від ферментативного гідролізу в організмі і, за рахунок цього, продовження періоду напіввиведення (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Описані багато полімерних систем для доставки білків (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release*

9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

Нещодавно були розроблені ліпосоми з підвищеною стабільністю в сироватці і більш тривалим періодом напіввиведення з системи кровообігу (дивись, наприклад, патент США № 5741516, виданий Webb). Крім того, описані різні способи використання ліпосом і подібних ліпосомам препаратів як потенційних носіїв для лікарського засобу (дивись, наприклад, патент США № 5567434, виданий Szoka; патент США № 5552157, виданий Yagi; патент США № 5565213, виданий Nakamori; патент США № 5738868, виданий Shinkarenko; і патент США № 5795587, виданий Gao).

Для черезшкірних застосувань інгібуючі MASP-2 антитіла і поліпептиди можна об'єднувати з іншими прийнятними інгредієнтами, такими як носії і/або ад'юванти. Відносно природи таких інших інгредієнтів обмеження відсутні, за винятком того, що вони повинні бути фармацевтично прийнятними для їх запланованого введення, і не повинні знижувати активність активних інгредієнтів композиції. Приклади відповідних середовищ включають мазі, креми, гелі або суспензії, з додаванням, або без додавання, очищеного колагену. Інгібуючими MASP-2 антитілами і поліпептидами також можна просочувати черезшкірні пластири, пов'язки і перев'язочні засоби, переважно в рідкій або напіврідкій формі.

Композиції за даним винаходом можна системно вводити на періодичній основі, з інтервалами, визначеними для підтримки бажаного рівня терапевтичного ефекту. Наприклад, композиції можна вводити, наприклад, підшкірною ін'єкцією, кожні дві-чотири тижні, або менш часто. Режим дозування буде визначати лікар з урахуванням різних факторів, які можуть впливати на дію поєднання засобів. Такі чинники будуть включати ступінь прогресування стану, що піддається лікуванню, вік, стать і масу тіла пацієнта, а також інші клінічні чинники. Доза кожного окремого засобу буде варіюватися залежно від інгібуючого MASP-2 засобу, який включений в композицію, а також від наявності і природи будь-якої середовища для доставки лікарського засобу (наприклад, середовища для доставки з уповільненим вивільненням). Крім того, кількість дози можна коректувати залежно від частоти введення і фармакокінетики засобу(засобів), що доставляється.

Локальна доставка

Використовуваний в цьому документі термін "локальна" доставка означає застосування лікарського засобу безпосереднє в ділянці планованої локалізованої дії, або поблизу неї, і може включати, наприклад, топічну доставку на шкіру або інші уражені тканини, офтальмічну доставку, інтратекальне (і/т), інтрацеребровентрикулярне (і/цв), внутрішньосуглобове, внутрішньопорожнинне, інтракраніальне або внутрішньоміхурове введення, розміщення або зрошування. Локальне введення може бути переважним для можливості введення більш низької дози, щоб уникнути системних побічних ефектів і для більш точного контролю часу доставки і концентрації активних засобів в зоні локальної доставки. Локальне введення забезпечує відому концентрацію в цільовій ділянці, незалежно від відмінностей у пацієнтів метаболізму, кровотоку і так далі. Краще контролювання дози також забезпечується при прямому способі доставки.

Локальну доставку інгібуючого MASP-2 засобу можна здійснювати в контексті хірургічних методів лікування захворювання або стану, наприклад, в процесі таких процедур, як артеріальному шунтування, атеректомія, лазерні процедури, ультразвукові процедури, балонна ангіопластика і встановлення стенту. Наприклад, інгібітор MASP-2 можна вводити суб'єкту в поєднанні з процедурою балонної ангіопластики. Процедура балонної ангіопластики включає введення катетера зі спущеним балоном в артерію. Спущений балон вміщують поблизу атеросклеротичної бляшки і надувають, так що бляшка притискається до стінки судини. У результаті поверхня балона знаходиться в контакті з шаром клітин судинного ендотелію на поверхні кровоносної судини. Інгібуючий MASP-2 засіб можна з'єднувати з катетером для балонної ангіопластики таким чином, який допускає вивільнення засобу в зоні атеросклеротичної бляшки. Засіб можна з'єднувати з катетером для балонної ангіопластики стандартними методами, відомими в даній галузі. Наприклад, засіб можна зберігати в компартменті балонного катетера до роздування балона, після чого він вивільняється в локальне середовище. Альтернативно, засобом можна просочувати поверхню балона так, що він вступає в контакт з клітинами артеріальної стінки по мірі роздування балона. Засіб також можна доставляти в перфорованому балонному катетері, такому як ті, які описані в Flugelman, M.Y., et al., Circulation 85:1110-1117, 1992. Дивись опубліковану PCT заявку WO 95/23161 для

опису ілюстративної процедури приєднання терапевтичного білка до катетера для балонної ангіопластики. Аналогічно, інгібуючий MASP-2 засіб можна включати в гель або полімерне покриття, нанесене на стент, або можна включати в матеріал стенту, внаслідок чого стент випускає інгібуючий MASP-2 засіб після його розміщення в судині.

Інгібуючі MASP-2 композиції, що використовуються в лікуванні артриту і інших скелетно-м'язових захворювань, можна локально доставляти внутрішньосуглобовою ін'єкцією. Такі композиції, переважно, можуть містити середовище для доставки з уповільненим вивільненням. Як додатковий приклад випадків, в яких може бути бажаною локальна доставка, інгібуючі MASP-2 композиції, що використовуються в лікуванні захворювань сечостатевої системи, можна вводити по краплях в сечовий міхур або в інший відділ сечостатевої системи.

Покриття на медичних пристроях

Інгібуючі MASP-2 засоби, такі як антитіла і інгібуючі пептиди, можуть бути іммобілізовані на (або всередині) поверхні імплантованого або прикріплюваного медичного пристрою. Модифікована поверхня, як правило, буде знаходитися в контакт з живою тканиною після імплантації в тіло тварини. "Імплантований або прикріплюваний медичний пристрій" означає будь-який пристрій, який імплантують, або прикріплюють, в тканину тіла тварини, для нормального функціонування пристрою (наприклад, стенти і імплантовані пристрої для доставки лікарського засобу). Такі імплантовані або прикріплювані медичні пристрої можуть бути виконані, наприклад, з нітроцелюлози, діазоцелюлози, скла, полістиролу, полівінілхлориду, поліпропілену, поліетилену, декстрану, сефарози, агару, крохмалю, нейлону, нержавіючої сталі, титану і біорозкладаних і/або біосумісних полімерів. Зв'язування білка з пристроєм можна здійснювати будь-яким методом, який не приводить до порушення біологічної активності зв'язаного білка, наприклад, шляхом приєднання одного або обох з N- і C-кінцевих залишків білка до пристрою. Приєднання також можна виконувати через один або більше внутрішніх сайтів білка. Також можна використовувати декілька ділянок приєднання (як всередині, так і на кінцях білка). Поверхню імплантованого або прикріплюваного медичного пристрою можна модифікувати для включення функціональних груп (наприклад, карбоксильних, амідних, аміногруп, ефірних, гідроксильних, ціано, нітридо, сульфамідо, ацетильних, епоксидних, силанових, ангідридних, сукцинімідних, азидо) для іммобілізації на них білка. Хімічні реакції зв'язування включають, але без обмеження, утворення складного ефіру, простого ефіру, амідів, азидо- і сульфамідо-похідних, ціанатів і інших зв'язків з функціональними групами, доступними на анти-MASP-2 антитілах або інгібуючих пептидах. Анти-MASP-2 антитіла або інгібуючі фрагменти також можна приєднувати не ковалентно за рахунок додавання до білка послідовності афінної мітки, такий як GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, Gene 67:31, 1988), полігістидинового фрагмента (E. Hochuli et al., J. Chromatog. 411:77, 1987) або біотину. Такі афінні мітки можна використовувати для оборотного приєднання білка до пристрою.

Білки також можна ковалентно приєднувати до поверхні корпусу пристрою, наприклад, за рахунок ковалентної активації поверхні медичного пристрою. Як репрезентативний приклад, білок(ки) позаклітинного матриксу можна приєднувати до корпусу пристрою з використанням будь-якої з наступних пар реакційноздатних груп (один член пари знаходиться на поверхні корпусу пристрою, і інший член пари знаходиться на білку(ках) позаклітинного матриксу: гідроксил/карбонова кислота для утворення складноефірного зв'язку; гідроксил/ангідрид для утворення складноефірного зв'язку; гідроксил/ізоціанат для утворення уретанового зв'язку. Поверхню корпусу пристрою, яка не має корисних реакційноздатних груп, можна обробляти плазмою, що утворюється височастотним розрядом (RFGD), виконуючи труєння для створення реакційноздатних груп, які сприяють відкладенню білка(ів) позаклітинного матриксу (наприклад, обробляти кисневою плазмою для введення кисневмісних груп; обробляти пропіламіновою плазмою для введення аміногруп).

Інгібуючі MASP-2 засоби, що включають молекули нуклеїнової кислоти, наприклад, антисмислової, РНКі або ДНК, що кодує пептидні інгібітори, можна занурювати в пористі матриці, приєднані до корпусу пристрою. Репрезентативними пористими матрицями, які можна використовувати для створення поверхневого шару, є матриці, отримані з колагену сухожилів і шкіри, які можна отримувати з множини комерційних джерел (наприклад, Sigma і Collagen Corporation), або колагенові матриці, отримані, як описано в патентах США № 4394370, виданому Jefferies, і 4975527, виданому Koezuka. Один колагеновий матеріал називається UltraFiber™ і доступний від компанії Norian Corp. (Mountain View, California).

Також при необхідності можна використовувати деякі полімерні матриці, які містять акрилові складноефірні полімери і полімери молочної кислоти, як описано, наприклад, в патентах США № 4526909 і 4563489, виданих Urist. Конкретними прикладами корисних полімерів є полімери ортоєфірів, ангідридів, пропілен-фумаратів, або полімер з мономерів однієї або більше α -

гідроксикарбонових кислот (наприклад, α -гідроксіоцтової кислоти (гліколевої кислоти) і/або α -гідроксипропіонової кислоти (молочної кислоти)).

Режими лікування

У випадку профілактичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який схильний, або з іншої причини має ризик розвитку стану, пов'язаного з MASP-2-залежною активацією комплементу, в кількості, достатній для усунення або зменшення ризику розвитку симптомів стану. У випадку терапевтичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який ймовірно або фактично страждає від стану, пов'язаного з MASP-2-залежною активацією комплементу, в терапевтично ефективній кількості, достатній для полегшення або щонайменше часткового зменшення симптомів стану. Як в профілактичному, так і в терапевтичному, режимах композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити в декількох дозах до досягнення достатнього терапевтичного результату у суб'єкта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом можна виконувати шляхом однократного введення композиції або шляхом обмеженої кількості послідовних введень для лікування гострого стану, наприклад, реперфузійного пошкодження або іншого травматичного пошкодження. Альтернативно, композицію можна вводити з періодичними інтервалами протягом тривалого періоду часу для лікування хронічних станів, наприклад, артритів або псоріазу.

Способи і композиції за даним винаходом можна використовувати для інгібування запалення і пов'язаних процесів, які, як правило, виникають внаслідок діагностичних і терапевтичних медичних і хірургічних процедур. Для інгібування таких процесів інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна застосовувати періпроцедурно. Використовуваний в цьому документі термін "періпроцедурно" стосується введення інгібуючої композиції препроцедурно і/або інтрапроцедурно, і/або постпроцедурно, тобто, до процедури, до і в процесі процедури, до і після процедури, до, в процесі і після процедури, в процесі процедури, в процесі і після процедури або після процедури. Періпроцедурне застосування можна здійснювати шляхом локального введення композиції в ділянку проведення операції або процедури, наприклад, шляхом ін'єкції, або безперервного або переривистого зрошування ділянки, або шляхом системного введення. Відповідні способи локальної періопераційної доставки розчинів інгібуючого MASP-2 засобу описані в патентах США № 6420432, виданому Demopoulos, і № 6645168, виданому Demopoulos. Відповідні способи локальної доставки хондропротективних композицій, що містять інгібуючий MASP-2 засіб(i), описані в міжнародній РСТ патентній заявці WO 01/07067 A2. Відповідні способи і композиції для направленої системної доставки хондропротективних композицій, що містять інгібуючий MASP-2 засіб(i), описані в міжнародній РСТ патентній заявці WO 03/063799 A2.

У одному аспекті винаходу фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (ТМА). У одному варіанті здійснення ТМА вибирають з групи, яка складається з гемолітичного уремичного синдрому (HUS), тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП) і атипового гемолітичного уремичного синдрому (аHUS). У одному варіанті здійснення ТМА являє собою аHUS. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з аHUS під час гострої фази захворювання. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з аHUS під час фази ремісії (тобто, суб'єкту, який відновився, або частково відновився, після епізоду гострої фази аHUS, при цьому на ремісію вказує, наприклад, підвищення кількості тромбоцитів і/або зниження сироваткових концентрацій LDH, наприклад, як описано в публікації Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання). У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА, яка являє собою (i) ТМА в результаті раку; (ii) ТМА внаслідок хіміотерапії або (iii) ТМА внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, наприклад, трансплантації нирки або трансплантації алогенних гемопоетичних стовбурових клітин). У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, синдрому Апшо-Шульмана (USS). У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, хвороби Дегоса. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS). У випадку терапевтичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТМА, в терапевтично ефективній кількості, достатній для інгібування утворення тромбів, полегшення або щонайменше часткового зменшення симптомів стану.

Як в профілактичному, так і в терапевтичному, режимах композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити в декількох дозах до досягнення достатнього терапевтичного результату у суб'єкта. У одному варіанті здійснення винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє

собою анти-MASP-2 антитіло, яке переважно можна вводити дорослому пацієнту (наприклад, дорослому пацієнту зі середньою масою тіла 70 кг) в дозі від 0,1 мг до 10000 мг, більш переважно від 1,0 мг до 5000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 2000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 1000 мг і ще більш переважно від 50,0 мг до 500 мг. Для малолітніх пацієнтів дозу можна коректувати пропорційно масі тіла пацієнта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом можна виконувати шляхом однократного введення композиції або шляхом обмеженої кількості послідовних введень для лікування ТМА. Альтернативно, композицію можна вводити з періодичними інтервалами, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці, протягом тривалого періоду часу для лікування ТМА.

У деяких варіантах здійснення суб'єкт, страждаючий від, або маючий ризик розвитку, ТМА, отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції за винаходом, утримуючий інгібітор MASP-2, і додаткове введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою екулізумаб.

У одному аспекті винаходу фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який схильний, або з іншої причини має ризик розвитку aHUS, в кількості, достатній для усунення або зменшення ризику розвитку симптомів стану. У випадку терапевтичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який приблизно або фактично страждає від aHUS, в терапевтично ефективній кількості, достатній для полегшення або щонайменше часткового зменшення симптомів стану. У одному аспекті винаходу перед введенням суб'єкт може бути обстежений для визначення того, чи має суб'єкт один або більше симптомів aHUS, включаючи (i) анемію, (ii) тромбоцитопенію, (iii) ниркову недостатність і (iv) підвищений рівень креатиніну, і потім композицію за даним винаходом вводять в ефективній кількості і протягом достатнього періоду часу для ослаблення цього симптому(ів).

У іншому аспекті винаходу інгібуючі MASP-2 композиції за даним винаходом можна використовувати для профілактичного введення суб'єкту, який має підвищений ризик розвитку aHUS, і за рахунок цього зменшення імовірності того, що у суб'єкта розвинеться aHUS. Наявність у суб'єкта генетичного маркера, який, як відомо, асоційований з aHUS, спочатку визначають шляхом проведення генетичного скринінгу зразка, отриманого від суб'єкта, і визначення наявності щонайменше одного генетичного маркера, пов'язаного з aHUS: фактора Н комплементу (CFH), фактора І (CFI), фактора В (CFB), мембранного кофактора CD46, C3, пов'язаного з фактором Н комплементу білка (CFHR1), антикоагулянтного білка тромбомодуліну (THBD), зв'язаного з фактором Н комплементу білка 3 (CFHR3) і пов'язаного з фактором Н комплементу білка 4 (CFHR4). Потім проводять періодичний (наприклад, щомісяця, щоквартально, двічі на рік або щорічно) моніторинг суб'єкта для визначення наявності або відсутності щонайменше одного симптому aHUS, такого як анемія, тромбоцитопенія, ниркова недостатність і підвищений рівень креатиніну. Після визначення наявності щонайменше одного з цих симптомів суб'єкту може бути введене інгібуючий MASP-2 засіб, ефективний для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу, в ефективній кількості і протягом достатнього періоду часу для ослаблення вказаних одного або більше симптомів. У наступному аспекті даного винаходу можна проводити моніторинг суб'єкта, що має підвищений ризик розвитку aHUS, як встановлено після проведення скринінгу і визначення наявності однієї з генетичних маркерів, пов'язаних з aHUS, відносно виникнення події, яке, як відомо, пов'язано з ініціюванням клінічних симптомів aHUS, включаючи вплив лікарського засобу, інфекцію (наприклад, бактеріальну інфекцію), злоякісне новоутворення, травму, трансплантацію органу або тканини і вагітність.

У наступному аспекті даного винаходу композицію, що містить кількість інгібуючого MASP-2 засобу, ефективну для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу, можна вводити суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, атипового гемолітичного уремичного синдрому (aHUS) внаслідок інфекції. Наприклад, пацієнта, страждаючого від, або маючого ризик розвитку, не ентерального aHUS, пов'язаного з інфекцією, що викликається *S. pneumoniae*, можна лікувати композиціями за даним винаходом.

У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, який страждає на aHUS, спочатку можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, яку вводять через встановлений катетер, наприклад, встановлений внутрішньовенний катетер або встановлений підшкірний

катетер, протягом першого періоду часу, такого як одна година, дванадцять годин, один день, два дні або три дні. Потім суб'єкта можна лікувати протягом другого періоду часу інгібуючою MASP-2 композицією, що вводиться звичайними підшкірними ін'єкціями, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на aHUS, без плазмаферезу (тобто, суб'єкту, чиї симптоми aHUS не лікували плазмаферезом і не лікують плазмаферезом в період лікування інгібуючою MASP-2 композицією), щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на aHUS, в поєднанні з лікуванням пацієнта плазмаферезом. Наприклад, суб'єкту, який одержує лікування плазмаферезом, потім можна вводити інгібуючу MASP-2 композицію, після проведення, або почергово з проведенням, плазмаферезу.

У наступному аспекті даного винаходу можна проводити моніторинг суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, aHUS і одержує лікування інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, визначаючи періодично, наприклад, кожні дванадцять годин або щодня, рівень щонайменше одного фактора комплементу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією.

Як в профілактичному, так і в терапевтичному, режимах композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити в декількох дозах до досягнення достатнього терапевтичного результату у суб'єкта. У одному варіанті здійснення винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, яке переважно можна вводити дорослому пацієнту (наприклад, дорослому пацієнту зі середньою масою тіла 70 кг) в дозі від 0,1 мг до 10000 мг, більш переважно від 1,0 мг до 5000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 2000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 1000 мг і ще більш переважно від 50,0 мг до 500 мг. Для малолітніх пацієнтів дозу можна коректувати пропорційно масі тіла пацієнта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом можна виконувати шляхом однократного введення композиції або шляхом обмеженої кількості послідовних введень для лікування aHUS. Альтернативно, композицію можна вводити з періодичними інтервалами, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці, протягом тривалого періоду часу для лікування aHUS.

У деяких варіантах здійснення суб'єкт, який страждає на aHUS, отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції за винаходом, утримуючій інгібітор MASP-2, і додаткове введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою екулізумаб.

У одному аспекті винаходу фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який схильний, або з іншої причини має ризик розвитку HUS, в кількості, достатній для усунення або зменшення ризику розвитку симптомів стану. У випадку терапевтичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який приблизно або фактично страждає від HUS, в терапевтично ефективній кількості, достатній для полегшення або щонайменше часткового зменшення симптомів стану.

У іншому аспекті даного винаходу імовірність розвитку порушення ниркової функції у суб'єкта, що має ризик розвитку HUS, можна зменшувати шляхом введення суб'єкту інгібуючої MASP-2 композиції за даним винаходом в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. Наприклад, суб'єкт, що має ризик розвитку HUS і що підлягає лікуванню інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, може мати один або більше симптомів, пов'язаних з HUS, включаючи діарею, рівень гематокриту нижче за 30 % з ознаками внутрішньосудинного руйнування еритроцитів в мазку крові, тромбоцитопенію і підвищені рівні креатиніну. Як наступний приклад, суб'єкт, що має ризик розвитку HUS і підлягає лікуванню інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, може бути інфікований *E. coli*, *Shigella* або *Salmonella*. Таких суб'єктів, інфікованих *E. coli*, *Shigella* або *Salmonella*, можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом в поєднанні з лікуванням антибіотиком

або, альтернативно, можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією без одночасного лікування антибіотиком, зокрема, у випадку ентерогенної *E. coli*, при якій використання антибіотиків протипоказане. Суб'єкт, інфікований ентерогенною *E. coli*, який отримувач лікування антибіотиком, може мати підвищений ризик розвитку HUS, і його може бути переважно лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом для зниження цього ризику. Суб'єкта, інфікованого ентерогенною *E. coli*, можна лікувати протягом першого періоду часу інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом без використання антибіотика, а потім протягом другого періоду часу лікувати як інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, так і антибіотиком.

У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, який страждає на HUS, спочатку можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, яку вводять через встановлений катетер, наприклад, встановлений внутрішньовенний катетер або встановлений підшкірний катетер, протягом першого періоду часу, такого як одна година, дванадцять годин, один день, два дні або три дні. Потім суб'єкта можна лікувати протягом другого періоду часу інгібуючою MASP-2 композицією, що вводиться звичайними підшкірними ін'єкціями, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на HUS, без плазмаферезу (тобто, суб'єкту, чиї симптоми HUS не лікували плазмаферезом і не лікують плазмаферезом в період лікування інгібуючою MASP-2 композицією), щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на HUS, в поєднанні з лікуванням пацієнта плазмаферезом. Наприклад, суб'єкту, який одержує лікування плазмаферезом, потім можна вводити інгібуючу MASP-2 композицію, після проведення, або по чергово з проведенням, плазмаферезу.

У наступному аспекті даного винаходу можна проводити моніторинг суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, HUS і одержуючого лікування інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, визначаючи періодично, наприклад, кожні дванадцять годин або щодня, рівень щонайменше одного фактора комплементу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією.

Як в профілактичному, так і в терапевтичному, режимах композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити в декількох дозах до досягнення достатнього терапевтичного результату у суб'єкта. У одному варіанті здійснення винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, яке переважно можна вводити дорослому пацієнту (наприклад, дорослому пацієнту зі середньою масою тіла 70 кг) в дозі від 0,1 мг до 10000 мг, більш переважно від 1,0 мг до 5000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 2000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 1,000 мг, і ще більш переважно від 50,0 мг до 500 мг. Для малолітніх пацієнтів дозу можна коректувати пропорційно масі тіла пацієнта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом можна виконувати шляхом однократного введення композиції або шляхом обмеженої кількості послідовних введень для лікування HUS. Альтернативно, композицію можна вводити з періодичними інтервалами, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці, протягом тривалого періоду часу для лікування HUS.

У деяких варіантах здійснення суб'єкт, який страждає на HUS, отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції за винаходом, утримуючий інгібітор MASP-2, і додаткове введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою екулізумаб.

У одному аспекті винаходу фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який схильний, або з іншої причини має ризик розвитку ТТП, в кількості, достатній для усунення або зменшення ризику розвитку симптомів стану. У випадку терапевтичного застосування фармацевтичні композиції вводять суб'єкту, який приблизно або фактично страждає від ТТП, в терапевтично ефективній кількості, достатній для полегшення або щонайменше часткового зменшення

симптомів стану.

У іншому аспекті даного винаходу суб'єкта, що має один або більш з симптомів ТТП, включаючи поразку центральної нервової системи, тромбоцитопенію, тяжке ураження серця, тяжке ураження легких, інфаркт кишечника і гангрена, можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом. У іншому аспекті даного винаходу суб'єкта, що має, як визначено, знижений рівень ADAMTS-13, а також позитивні результати тесту на наявність інгібітора (тобто, антитіла) ADAMTS-13, можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом. У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, що має позитивні результати тесту на наявність інгібітора ADAMTS-13, можна лікувати імунодепресантом (наприклад, кортикостероїдами, ритуксаном або циклоспорином) одночасно з лікуванням інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом. У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, що має, як визначено, знижений рівень ADAMTS-13, а також позитивні результати тесту на наявність інгібітора ADAMTS-13, можна лікувати ADAMTS-13 одночасно з лікуванням інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом.

У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, який страждає на ТТП, спочатку можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, яку вводять через встановлений катетер, наприклад, встановлений внутрішньовенний катетер або встановлений підшкірний катетер, протягом першого періоду часу, такого як одна година, дванадцять годин, один день, два дні або три дні. Потім суб'єкта можна лікувати протягом другого періоду часу інгібуючою MASP-2 композицією, що вводиться звичайними підшкірними ін'єкціями, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на ТТП, без плазмаферезу (тобто, суб'єкту, чий симптоми ТТП не лікували плазмаферезом і не лікують плазмаферезом в період лікування інгібуючою MASP-2 композицією), щоб уникнути потенційних ускладнень плазмаферезу, що включають кровотечу, інфікування і вплив хвороботворних і/або алергічних факторів, присутніх в плазмі донора, або у випадку суб'єкта, що не переносить плазмаферез, або в умовах, коли плазмаферез недоступний.

У наступному аспекті даного винаходу інгібуючу MASP-2 композицію за даним винаходом можна вводити суб'єкту, який страждає на ТТП, в поєднанні з лікуванням пацієнта плазмаферезом. Наприклад, суб'єкту, який одержує лікування плазмаферезом, потім можна вводити інгібуючу MASP-2 композицію, після проведення, або по чергово з проведенням, плазмаферезу.

У наступному аспекті даного винаходу суб'єкта, який страждає на рефрактерну ТТП, тобто, суб'єкта, чий симптоми ТТП не змінювалися адекватно у відповідь на інше лікування, таке як плазмаферез, можна лікувати інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом з використанням, або без використання, додаткового плазмаферезу.

У наступному аспекті даного винаходу можна проводити моніторинг суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, ТТП і одержуючого лікування інгібуючою MASP-2 композицією за даним винаходом, визначаючи періодично, наприклад, кожні дванадцять годин або щодня, рівень щонайменше одного фактора комплементу, при цьому визначення зниженого рівня щонайменше одного фактора комплементу порівняно зі стандартним значенням, або значенням у здорового контрольного суб'єкта, вказує на необхідність продовження лікування композицією.

Як в профілактичному, так і в терапевтичному, режимах композиції, що містять інгібуючі MASP-2 засоби, можна вводити в декількох дозах до досягнення достатнього терапевтичного результату у суб'єкта. У одному варіанті здійснення винаходу інгібуючий MASP-2 засіб являє собою анти-MASP-2 антитіло, яке переважно можна вводити дорослому пацієнту (наприклад, дорослому пацієнту зі середньою масою тіла 70 кг) в дозі від 0,1 мг до 10000 мг, більш переважно від 1,0 мг до 5000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 2000 мг, більш переважно від 10,0 мг до 1000 мг і ще більш переважно від 50,0 мг до 500 мг. Для малолітніх пацієнтів дозу можна коректувати пропорційно масі тіла пацієнта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом можна виконувати шляхом однократного введення композиції або шляхом обмеженої кількості послідовних введень для лікування ТТП. Альтернативно, композицію можна вводити з періодичними інтервалами, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, раз на два тижні, щомісяця або раз на два місяці, протягом тривалого періоду часу для лікування ТТП.

У деяких варіантах здійснення суб'єкт, який страждає на ТТП, отримувач раніше, або отримує в цей час, лікування інгібітором термінального компонента комплементу, якого інгібує розщеплення білка C5 комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції за винаходом, утримуючий інгібітор MASP-2, і додаткове введення суб'єкту інгібітора термінального компонента комплементу, який інгібує розщеплення білка C5

комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою гуманізоване анти-C5 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент. У деяких варіантах здійснення інгібітор термінального компонента комплементу являє собою екулізумаб.

VI. Приклади

Наступні приклади лише ілюструють найкращий спосіб здійснення на практиці винаходу, але не призначені для обмеження винаходу. Всі літературні джерела, що цитуються в цьому документі, спеціально включені в цей документ за допомогою посилання.

Приклад 1

У даному прикладі описане отримання лінії мишей з дефіцитом MASP-2 (MASP-2^{-/-}), але з достатньою кількістю MAr19 (MAr19^{+/+}).

Матеріали і методи

Був сконструйований направлений вектор pKO-NTKV 1901 для руйнування трьох екзонів, що кодують С-кінцеву частину мишачого MASP-2, включаючи екзон, що кодує домен серинової протеази, як показано на ФІГУРІ 3. PKO-NTKV 1901 використовували для трансфікування мишачої ES лінії клітин E14.1 a (SV129 Ola). Були відібрані стійкі до неоміцину і чутливі до тимідинкінази клони. Був проведений скринінг 600 ES клонів, з них були вибрані чотири різні клони, які, як було підтверджено методом саузерн-блотингу, містили очікувану вибірккову направлену подію рекомбінації, як показано на ФІГУРІ 3. З цих чотирьох позитивних клонів були отримані химери шляхом перенесення ембріонів. Потім було проведене зворотне схрещування химер на генетичному фоні C57/BL6 для отримання трансгенних самців. Трансгенних самців схрещували з самицями, отримуючи потомство F1, в якому 50 % нащадків демонстрували гетерозиготність відносно зруйнованого гена MASP-2. Гетерозиготних мишей схрещували між собою, отримуючи гомозиготне потомство з дефіцитом MASP-2 в співвідношенні з гетерозиготними і дикого типу мишами, яке складає 1:2:1, відповідно.

Результати і фенотип: Отримані гомозиготні миші з дефіцитом MASP-2^{-/-}, як встановлено, були життєздатними і фертильними, і мали дефіцит MASP-2 за результатами саузерн-блотингу, що проводиться для підтвердження правильної події таргетування, за результатами нозерн-блотингу для підтвердження відсутності мРНК MASP-2, і за результатами вестерн-блотингу для підтвердження відсутності білка MASP-2 (дані не представлені). Наявність мРНК MAr19 і відсутність мРНК MASP-2 додатково підтверджували з використанням ЗТ-ПЛР з часовим розділенням на приладі LightCycler. Миші MASP-2^{-/-} продовжували експресувати мРНК і білок MAr19, MASP-1 і MASP-3, як і очікувалося (дані не представлені). Наявність і відносна представленість у мишей MASP-2^{-/-} мРНК для пропердину, фактора В, фактора D, C4, C2, і C3 були оцінені в аналізі з використанням LightCycler і, як встановлено, були ідентичні таким у контрольних однопоносників дикого типу (дані не представлені). У плазмі гомозиготних мишей MASP-2^{-/-} повністю була відсутня активація комплементу, яка опосередковується лектиновим шляхом, як додатково описано в прикладі 2.

Отримання лінії MASP-2^{-/-} на чистому фоні C57BL6: проводили зворотне схрещування мишей MASP-2^{-/-} з мишами чистої лінії C57BL6 протягом дев'яти поколінь до використання лінії MASP-2^{-/-} як експериментальної тваринної моделі.

Також отримували трансгенну лінію мишей, які були MASP-2^{-/-}, MAr19^{+/+} по мишачих білках і експресували трансген людського MASP-2 (нокаут мишачого MASP-2 і нокін людського MASP-2), таким чином:

Матеріали і методи

Був сконструйований мініген, що кодує людський MASP-2, який називається "міні hMASP-2" (SEQ ID NO: 49), показаний на ФІГУРІ 4, який включає ділянку промотору людського гена MASP-2, включаючи перші 3 екзона (від екзона 1 до екзона 3), за якою йде послідовність кДНК, що являє собою кодуючу послідовність наступних 8 екзонів, таким чином, був закодований повнорозмірний білок MASP-2 під контролем його ендегенного промотору. Мініконструкт hMASP-2 вводили ін'єкцією в запліднені яйцеклітини мишей MASP-2^{-/-} для заміни відсутнього мишачого гена MASP-2 експресованим трансгеном людського MASP-2.

Приклад 2

У даному прикладі показано, що MASP-2 необхідний для активації комплементу через лектиновий шлях.

Матеріали і методи

Специфічний для лектинового шляху аналіз розщеплення C4: Аналіз розщеплення C4 описаний в публікації Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001), в цьому аналізі вимірюють активацію лектинового шляху на основі ліптейхоєвої кислоти (LTA) з *S. aureus*, яка зв'язує L-фіколін. Аналіз, описаний Petersen зі співавторами, (2001), був адаптований для вимірювання активації лектинового шляху через MBL, шляхом нанесення на планшет LPS і

манану або зимозану, з подальшим доданням сироватки від мишей MASP-2-/-, як описано нижче. Аналіз був також модифікований для усунення можливості розщеплення C4 внаслідок класичного шляху. Це було досягнуте за рахунок використання буфера для розведення зразків, що містить 1 М NaCl, що допускає високоафінне зв'язування компонентів впізнавання лектинового шляху з їх лігандами, але запобігає активації ендogenous C4, тим самим виключається участь класичного шляху за рахунок дисоціації комплексу C1. Коротко, в модифікованому аналізі зразки сироватки (розведеної буфером з високим вмістом солі (1 М NaCl)) додають в покриті лігандом планшети, з подальшим доданням постійної кількості очищеного C4 в буфері з фізіологічною концентрацією солі. Зв'язані комплекси впізнавання, що містять MASP-2, розщеплюють C4, що приводить до відкладення C4b.

Аналітичні Методи

1) Планшети для мікротитрування Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, каталожний № 442404, Fisher Scientific) покривали мананом в концентрації 1 мкг/мл (M7504 Sigma) або будь-яким іншим лігандом (наприклад, таким як ті, які перераховані нижче), розбавленим в буфері для нанесення (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, рН 9,6).

У аналізі використовували наступні реагенти:

- манан (1 мкг/ямку манану (M7504 Sigma) в 100 мкл буфера для нанесення);
- зимозан (1 мкг/ямку зимозану (Sigma) в 100 мкл буфера для нанесення);
- LTA (1 мкг/ямку в 100 мкл буфера для нанесення або 2 мкг/ямку в 20 мкл метанола);
- 1 мкг специфічного для Н-фіколіну мАт 4Н5 в буфері для нанесення;
- PSA з *Aerococcus viridans* (2 мкг/ямку в 100 мкл буфера для нанесення);
- 100 мкл/ямку фіксованої в формаліні *S. aureus* DSM20233 (OD₅₅₀=0,5) в буфері для нанесення.

2) Планшети інкубували протягом ночі при 4 °С.

3) Після інкубації протягом ночі сайти зв'язування білка, що залишилися, насичували шляхом інкубації планшетів з 0,1 % HSA-TBS блокуючим буфером (0,1 % (мас./об.) HSA в 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, 1,5 мМ NaN₃, рН 7,4) протягом 1-3 годин, з подальшим промиванням планшетів 3X TBS/Tween/Ca²⁺ (TBS з 0,05 % Tween 20 і 5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, рН 7,4).

4) Тестовані зразки сироватки розбавляли в буфері зв'язування MBL (1 М NaCl), розбавлені зразки додавали в планшети і інкубували протягом ночі при 4 °С. Ямку, що містить тільки буфер, використовували як негативні контролю.

5) Після інкубації протягом ночі при 4 °С планшети промивали 3X TBS/Tween/Ca²⁺. У планшети потім додавали людський C4 (100 мкл/ямку, з концентрацією 1 мкг/мл, розведений в BBS (4 мМ барбітал, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, рН 7,4)) і інкубували протягом 90 хвилин при 37 °С. Планшети знову промивали 3X TBS/Tween/Ca²⁺.

6) Відкладення C4b виявляли за допомогою кон'югованих з лужною фосфатазою курячих антитіл проти людського C4с (розведених 1:1000 в TBS/Tween/Ca²⁺), які додавали в планшети і інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Потім планшети знову промивали 3X TBS/Tween/Ca²⁺.

7) Лужну фосфатазу виявляли шляхом додавання 100 мкл розчину субстрату п-нітрофенілфосфату, інкубації при кімнатній температурі протягом 20 хвилин і зняття свідчення при OD₄₀₅ на планшетному рідері.

Результати

На ФІГУРАХ 5А-В показана кількість відкладеного C4b на манані (ФІГУРА 5А) і зимозані (ФІГУРА 5В) в розведеній сироватці від мишей MASP-2+/+ (хрести), MASP-2+/- (заштриховані кружки) і MASP-2-/- (заштриховані трикутники). На ФІГУРІ 5С показана відносна активність C4-конвертази на планшетах, покритих зимозаном (білі стовпчики) або мананом (затінені стовпчики), у мишей MASP-2+/+ (n=5) і мишей MASP-2-/- (n=4), відносно мишей дикого типу (n=5), на основі вимірювання кількості відкладеного C4b, нормованого на сироватку дикого типу. Планки погрешностей відповідають стандартному відхиленню. Як показано на ФІГУРАХ 5А-С, в плазмі від мишей MASP-2-/- повністю відсутня активація комплексу, опосередкована лектиновим шляхом, на покритих мананом і зимозаном планшетах. Ці результати чітко свідчать про те, що MASP-2 є ефекторним компонентом лектинового шляху.

Рекомбінантний MASP-2 відновлює залежну від лектинового шляху активацію C4 в сироватці мишей MASP-2-/-

Для підтвердження того, що відсутність MASP-2 була безпосередньою причиною втрати залежної від лектинового шляху активації C4 у мишей MASP-2-/-, вивчали ефект додавання рекомбінантного білка MASP-2 до зразків сироватки в аналізі розщеплення C4, описаному вище. Рекомбінантні білки: функціонально активний мишачий MASP-2 і каталітично неактивний мишачий MASP-2A (в якому залишок серину в активному центрі домену серинової протеази був

замінений залишком аланіну) були отримані і очищені, як описано нижче в прикладі 3. Об'єднану сироватку від 4 мишей MASP-2/- преінкубували з рекомбінантним мишачим MASP-2 або неактивним рекомбінантним мишачим MASP-2A в зростаючих концентраціях білка, і активність C4-конвертази аналізували, як описано вище.

5 Результати

Як показано на ФІГУРІ 6, додавання функціонально активного мишачого рекомбінантного білка MASP-2 (незаштриховані трикутники) до сироватки, отриманої від мишей MASP-2/-, приводило до відновлення залежної від лектинового шляху активації C4 залежним від концентрації білка чином, в той час як каталітично неактивний мишачий білок MASP-2A (зірочки) не відновлював активацію C4. Результати, представлені на ФІГУРІ 6, нормовані на активацію C4, що спостерігається в об'єднаній сироватці мишей дикого типу (пунктирна лінія).

10 Приклад 3

У даному прикладі описана рекомбінантна експресія і продукування білка для рекомбінантних повнорозмірних людського, щурячого і мишачого MASP-2, отриманих з MASP-2 поліпептидів і каталітично інактивованих мутантних форм MASP-2.

Експресія повнорозмірного людського, мишачого і щурячого MASP-2

Повнорозмірну послідовність кДНК людського MASP-2 (SEQ ID NO: 4) також субклонували в експресійний вектор pCI-Neo (Promega) ссавців, який керує експресією під контролем області енхансера/промотору CMV в еукаріотичних клітинах (описано в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)). Кожну з повнорозмірної мишачої кДНК (SEQ ID NO: 50) і щурячої кДНК (SEQ ID NO: 53) MASP-2 субклонували в експресійний вектор pED. Експресійні вектори для MASP-2 потім трансфікували в адгерентну лінію DXB1 клітин яєчника китайського хом'яка з використанням стандартної процедури трансфекції з фосфатом кальцію, описаної в Maniatis et al., 1989. Клітини, трансфіковані цими конструктами, росли дуже повільно, це вказувало на те, що закодована протеаза є цитотоксичною.

Використовуючи інший підхід, конструкт мінігена (SEQ ID NO: 49), який містить кДНК людського MASP-2 під контролем його ендogenous промотору, тимчасово трансфікували в клітини яєчника китайського хом'яка (CHO). Людський білок MASP-2 секретувався в культуральне середовище і був виділений, як описано нижче.

Експресія повнорозмірного каталітично неактивного MASP-2

30 Обґрунтування

MASP-2 активується шляхом аутокаталітичного розщеплення після того, як підкомпоненти впізнавання MBL або фіколіні (L-фіколін, H-фіколін або M-фіколін) зв'язуються з їх відповідним вуглеводним патерном. Аутокаталітичне розщеплення, що приводить до активації MASP-2, часто відбувається в процесі виділення MASP-2 з сироватки, або в процесі очищення після рекомбінантної експресії. З метою отримання більш стабільного препарату білка для використання як антигена, створювали каталітично неактивну форму MASP-2, названу MASP-2A, шляхом заміни залишку серину, присутнього в каталітичній тріаді домену протеази залишком аланіну в щурячому (SEQ ID NO: 55 Ser617 на Ala617); в мишачому (SEQ ID NO: 52 Ser617 на Ala617); або в людському (SEQ ID NO: 3 Ser618 на Ala618) білці.

Для отримання каталітично неактивних людського і мишачого білків MASP-2A проводили сайт-направлений мутагенез з використанням олігонуклеотидів, наведених в ТАБЛИЦІ 5.

Олігонуклеотиди в ТАБЛИЦІ 5 були розроблені для відпалу ділянки людської і мишачої кДНК, що кодує ферментативно активний серин, і олігонуклеотиду, що містить неспівпадання, з метою зміни кодона серину на кодон аланіну. Наприклад, олігонуклеотиди для ПЛП SEQ ID NO: 56-59 використовували в поєднанні з людською кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) для ампліфікації ділянки від ініціюючого кодона до ферментативно активного серину і від серину до стоп-кодона, для створення повністю відкритої рамки зчитування з мутантного MASP-2A, що містить мутацію Ser618 на Ala618. Продукти ПЛП очищали після електрофорезу в агарозному гелі і обробки смуги, і створювали одиночне накладення аденозину з використанням стандартного методу нарощування ланцюга. MASP-2A з аденозиновим "хвостом" потім клонували у вектор pGEM-T easy і вводили трансформацією в E. coli.

Каталітично неактивний щурячий білок MASP-2A отримували шляхом обробки кіназою і відпалу SEQ ID NO: 64 і SEQ ID NO: 65, об'єднуючи ці два олігонуклеотиди в однакових молярних кількостях, нагріваючи при 100 °C протягом 2 хвилин і повільно охолоджуючи до кімнатної температури. Отриманий випалений фрагмент має Pst1 і Xba1 сумісні кінці і був вставлений замість фрагмента Pst1-Xba1 кДНК щурячого MASP-2 дикого типу (SEQ ID NO: 53), з отриманням щурячого MASP-2A.

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

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

Кожний з людського, мишачого і щурячого MASP-2A додатково субклонували в якій-небудь з експресійних векторів рED або рCI-Нео ссавців і трансфікували в клітини яєчника китайського хом'яка лінії DXB1, як описано нижче.

- 5 Використовуючи інший підхід, каталітично неактивну форму MASP-2 створювали з використанням методу, описаного в публікації Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001. Коротко, плазмиду, що містить кДНК повнорозмірного людського MASP-2 (описану Thiel et al., Nature 386:506, 1997), розщеплювали Xho1 і EcoR1, і кДНК MASP-2 (описану в цьому документі у вигляді SEQ ID NO: 4) клонували у відповідні сайти рестрикції бакуловірусного переносного вектора рFastBac1 (Life Technologies, NY). Потім Ser618 в активному центрі серинової протеази MASP-2 замінювали на Ala618, замінюючи дволанцюжковими олігонуклеотидами, що кодують пептидну ділянку амінокислот 610-625 (SEQ ID NO: 13), природну ділянку амінокислот 610-625, отримуючи повнорозмірний поліпептид MASP-2 з неактивним доменом протеази.
- 15 Конструювання експресійних плазмід, що містять поліпептидні ділянки з людського Masp-2
- Були отримані наступні конструкти з використанням сигнального пептиду MASP-2 (залишки 1-15 в SEQ ID NO: 5) для секреції різних доменів MASP-2. Конструкт для експресії домену CUB1 людського MASP-2 (SEQ ID NO: 8) отримували шляхом ПЛР-ампліфікації ділянки, що кодує залишки 1-121 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (відповідної N-кінцевому домену CUB1). Конструкт, який експресує домен CUBIEGF людського MASP-2 (SEQ ID NO: 9), отримували шляхом ПЛР-ампліфікації ділянки, що кодує залишки 1-166 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (відповідної N-кінцевому домену CUBIEGF). Конструкт, який експресує домен CUBIEGFCUBII людського MASP-2 (SEQ ID NO: 10), отримували шляхом ПЛР-ампліфікації ділянки, що кодує залишки 1-293 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (відповідної N-кінцевому домену CUBIEGFCUBII). Вищезгадані домени ампліфікували методом ПЛР, використовуючи полімерази Vent_R і рBS-MASP-2 як матрицю, відповідно до відомих методів ПЛР. Послідовність 5'-смыслового праймера CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO: 34) вносить сайт рестрикції BamHI (підкреслений) на 5'-кінці продуктів ПЛР. Антисмыслові праймери для кожного з доменів MASP-2, наведених нижче в ТАБЛИЦІ 5, розроблені для внесення стоп-кодона (виділено жирним шрифтом) після сайту EcoRI (підкреслений) на кінці кожного продукту ПЛР. Після ампліфікації фрагменти ДНК розщеплювали BamHI і EcoRI і клонували у відповідні сайти вектора рFastBac1. Отримані конструкти характеризували шляхом рестрикційного картування і підтверджували секвенуванням дДНК.
- 30

Таблиця 5:

ПРАЙМЕРИ ДЛЯ ПЛР MASP-2

Домен MASP-2	5'-праймер для ПЛР	3'-праймер для ПЛР
SEQ ID NO: 8 CUB1 (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)	5' <u>CGGGATCC</u> ATGAGGCTGCTGACCC TC 3' (SEQ ID NO: 34)	5' <u>GGA</u> KTTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO: 35)
SEQ ID NO: 9 CUBIEGF (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)	5' <u>CGGGATCC</u> ATGAGGCTGCTGACCC TC 3' (SEQ ID NO: 34)	5' <u>GGA</u> KTTCCTACAGGGCGCT 3' (SEQ ID NO: 36)
SEQ ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)	5' <u>CGGGATCC</u> ATGAGGCTGCTGACCC TC 3' (SEQ ID NO: 34)	5' <u>GGA</u> KTTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO: 37)
SEQ ID NO: 4 людський MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGACCCCTCGGGC CTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_прямий	5'TTAKAKTCACTAKTTATGTT CTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_зворотний
SEQ ID NO: 4 кДНК людського MASP-2	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_прямий	5'GTGCCCTCCTGCGTCACCTCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_зворотний
SEQ ID NO: 50 кДНК мишачого MASP-2	5'ATGAGGCTACTCATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_прямий	5'TTAGAKATTACTTATTATGT TCTCAKTC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_зворотний
SEQ ID NO: 50 кДНК мишачого MASP-2	5'CCCCCTGCGTCACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_прямий	5'CTGCAGAGGTGACGCAGG GGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_зворотний

Рекомбінантна експресія MASP-2 в еукаріотичних клітинах, і продукування ферментативно неактивних білків мишачого, щурячого і людського MASP-2A.

Експресійні конструкти MASP-2 і MASP-2A, описані вище, трансфікували в клітини DXB1 стандартним методом трансфекції з фосфатом кальцію (Maniatis et al., 1989). MASP-2A отримували в безсироватковому середовищі для гарантії того, що препарати не будуть забруднені іншими сироватковими білками. Середовище збирали з конфлюентних клітин через день (усього чотири рази). Рівень рекомбінантного MASP-2A складав в середньому приблизно 1,5 мг/літр культурального середовища для кожного з трьох видів білків.

Очищення білка MASP-2A

MASP-2A (Ser-Ala мутант, описаний вище) очищали афінною хроматографією на колонках з MBP-A-агарозою. Ця стратегія дозволяла проводити швидке очищення без використання додаткових міток. MASP-2A (100-200 мл середовища, розбавленого однаковим об'ємом буфера для нанесення (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, що містить 150 mM NaCl і 25 mM CaCl₂)) наносили на афінну колонку з MBP-агарозою (4 мл), попередньо урівноважену 10 мл буфера для нанесення. Після промивання ще 10 мл буфера для нанесення білок елюювали в 1-мл фракціях 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, що містить 1,25 M NaCl і 10 mM EDTA. Фракції, що містять MASP-2A, ідентифікували методом електрофорезу в SDS-поліакриламідному гелі. При необхідності MASP-2A додатково очищали методом іонообмінної хроматографії на колонці MonoQ (HR 5/5). Білок діалізували в буфері 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, що містить 50 mM NaCl, і наносили на колонку, урівноважену тим же буфером. Після промивання зв'язаний MASP-2A елюювали 0,05-1 M градієнтом NaCl в об'ємі 10 мл.

Результати

Вихід 0,25-0,5 мг білка MASP-2A отримували з 200 мл середовища. Молекулярна маса 77,5 кДа, визначена методом MALDI-MS, перевищувала розраховане значення для немодифікованого поліпептиду (73,5 кДа) внаслідок глікозилювання. Приєднання гліканів на кожному з сайтів N-глікозилювання було причиною маси, що спостерігається. MASP-2A мігрує у вигляді однієї смуги в SDS-поліакриламідних гелях, це свідчить про те, що він не був протеолітично розщеплений в процесі біосинтезу. Середньозважена молекулярна маса, визначена методом рівноважного ультрацентрифугування, відповідала розрахунковому значенню для гомодимерів глікозилизованого поліпептиду.

Отримання рекомбінантних поліпептидів людського Masp-2

Інший спосіб отримання рекомбінантних поліпептидів MASP-2 і MASP-2A описаний в Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Коротко, клітини комарів *Spodoptera frugiperda* (клітини Ready-Plaque Sf9, отримані від компанії Novagen, Madison, WI) вирощують і підтримують в безсироватковому середовищі Sf900II (Life Technologies) з додаванням 50 МО/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину (Life Technologies). Клітини комарів *Trichoplusia ni* (High Five) (надані Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) підтримують в середовищі TC100 (Life Technologies), що містить 10 % ЕБС (Dominique Dutscher, Brumath, France), з додаванням 50 МО/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину. Рекомбінантні бакуловіруси отримують з використанням системи Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмідну ДНК очищують з використанням системи очищення Qiagen midiprep (Qiagen) і використовують для трансфікування клітин комарів Sf9 за допомогою целфектину в середовищі Sf900 II SFM (Life Technologies) відповідно до протоколу виробника. Рекомбінантні вірусні частинки збирають через 4 дні, титрують в аналізі вірусного бляшкоутворення і ампліфікують, як описано King і Possee, в: *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992.

Клітини High Five ($1,75 \times 10^7$ клітин/175-см² флакон для культивування тканин) інфікують рекомбінантними вірусами, що містять послідовності поліпептидів MASP-2, при показнику множинності інфекції 2 в середовищі Sf900 II SFM при 28 °C протягом 96 год. Супернатанти збирають центрифугуванням, і додають діізопропілфосфорофлюоридат до кінцевої концентрації 1 mM.

Поліпептиди MASP-2 секретуються в культуральне середовище. Культуральні супернатанти діалізують проти 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM триетаноламіну гідрохлорид, pH 8,1, і наносять з швидкістю 1,5 мл/хв. на колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), урівноважену в тому ж буфері. Елюцію проводять з використанням 1,2 літра лінійного градієнта до 350 mM NaCl в тому ж буфері. Фракції, що містять рекомбінантні поліпептиди MASP-2, ідентифікують методом вестерн-блотингу, осаджують додаванням (NH₄)₂SO₄ до 60 % (мас./об.) і залишають на ніч при 4 °C. Осідання ресуспендують в буфері, що містить 145 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM триетаноламіну гідрохлорид, pH 7,4, і наносять на колонку TSK G3000

SWG (7,5×600 мм) (Tosohas, Montgomeryville, PA), урівноважену тим же буфером. Очищені поліпептиди потім концентрують до 0,3 мг/мл методом ультрафільтрації в мікроконцентрувальних пристроях Microsep (поріг відсікання по MM=10000) (Filtron, Karlstein, Germany).

5 Приклад 4

У даному прикладі описаний спосіб отримання поліклональних антитіл проти поліпептидів MASP-2.

Матеріали і методи

Антигени MASP-2

10 Поліклональну імунну сироватку проти людського MASP-2 отримують шляхом імунізації кроликів наступними виділеними поліпептидами MASP-2: людським MASP-2 (SEQ ID NO: 6), виділеним з сироватки; рекомбінантним людським MASP-2 (SEQ ID NO: 6), MASP-2A, що містить неактивний домен протеази (SEQ ID NO: 13), як описано в прикладі 3; і рекомбінантними CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) і CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 15 10), експресованими, як описано вище в прикладі 3.

Поліклональні антитіла: Кроликів у віці шести тижнів, примованих вакциною БЦЖ (бацила Кальметта-Герена), імунізують шляхом ін'єкції 100 мкг поліпептиду MASP-2 з концентрацією 100 мкг/мл в стерильному сольовому розчині. Ін'єкції виконують кожні 4 тижні, і титр антитіл визначають методом ELISA, як описано в прикладі 5. Культуральні супернатанти збирають для очищення антитіл афінною хроматографією на білку А.

20 Приклад 5

У даному прикладі описаний спосіб отримання мишачих моноклональних антитіл проти поліпептидів щурячого або людського MASP-2.

Матеріали і методи

25 Самцям мишей A/J (Harlan, Houston, Tex.) у віці 8-12 тижнів вводять підшкірною ін'єкцією 100 мкг поліпептидів людського, або щурячого, rMASP-2 або rMASP-2A (отриманих, як описано в прикладі 3) в повному ад'юванті Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл фосфатно-сольового буфера (PBS), pH 7,4. З двотижневими інтервалами мишам двічі вводять підшкірною ін'єкцією 50 мкг поліпептидів людського, або щурячого, rMASP-2 або rMASP-2A в неповному ад'юванті Фрейнда. У четвертий тиждень мишам вводять ін'єкцією 50 мкг поліпептидів людського, або щурячого, rMASP-2 або rMASP-2A в PBS, і через 4 дні проводять злиття клітин.

Для кожного злиття готують одноклітинні суспензії з селезінки імунізованої миші і використовують їх для злиття з клітинами мієломи Sp2/0. Проводять злиття 5×10^8 клітин Sp2/0 і 5×10^8 клітин селезінки в середовищі, що містить 50 % поліетиленгліколь (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) і 5 % диметилсульфоксид (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Потім клітини доводять до концентрації $1,5 \times 10^5$ клітин селезінки на 200 мкл суспензії в середовищі Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.) з доданням 10 % ембріональної бичачої сироватки, 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 0,1 мМ гіпоксантину, 0,4 мМ аміноптерину і 16 мкМ тимідину. Двісті мікролітрів клітинної суспензії додають в кожну ямку приблизно двадцяти 96-ямкових планшетів для культивування. Через приблизно десять днів культуральні супернатанти збирають для скринінгу на здатність до реагування з очищеним фактором MASP-2 в аналізі ELISA.

Аналіз ELISA

45 Ямку планшетів для титрування Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покривають шляхом додавання 50 мкл очищеного hMASP-2 або щурячого rMASP-2 (або rMASP-2A) в концентрації 50 нг/мл на ніч при кімнатній температурі. Низька концентрація покриваючого MASP-2 дозволяє відбирати високоафінні антитіла. Після видалення покриваючого розчину струшуванням планшетів додають 200 мкл BLOTTO (нежирне сухе молоко) в PBS в кожну ямку на одну годину для блокування неспецифічних сайтів. Через годину ямку промивають буфером PBST (PBS, що містить 0,05 % Tween 20). П'ятдесят мікролітрів культуральних супернатантів з кожної ямки зі злитими клітинами збирають і змішують з 50 мкл BLOTTO, а потім додають в окрему ямку планшетів для титрування. Після часу інкубації ямку промиває PBST. Мишачі антитіла, що зв'язалися, виявляють на основі реакції з антитілами кози проти IgG миші (Fc-специфічними), кон'югованими з пероксидазою хрину (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.), розведеними 1:2000 в BLOTTO. Розчин субстрату пероксидази, що містить 0,1 % 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (Sigma, St. Louis, Mo.), і 0,0003 % пероксид водню (Sigma) додають в ямку для розвитку забарвлення на 30 хвилин. Реакцію зупиняють доданням 50 мкл 2 М H₂SO₄ в кожну ямку. Оптичну густину при 450 нм реакційній суміші визначають з використанням рідера для ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

60 Аналіз зв'язування MASP-2

Культуральні супернатанти, позитивні за результатами аналізу ELISA на MASP-2, описаного вище, можна тестувати в аналізі зв'язування для визначення афінності зв'язування інгібуючих MASP-2 засобів відносно MASP-2. Аналогічний аналіз також можна використовувати для визначення того, чи зв'язуються інгібуючі засоби з іншими антигенами в системі комплементу.

Ямку полістирольних планшетів для титрування (96-ямкові планшети, середнє зв'язування, Corning Costar, Cambridge, MA) покриває MASP-2 (20 нг/100 мкл/ямку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в фосфатно-сольовому буфері (PBS), pH 7,4, протягом ночі при 4 °C. Після видалення аспірацією розчину MASP-2 ямки блокують PBS, що містить 1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA; Sigma Chemical), протягом 2 год. при кімнатній температурі. Ямки без нанесеного MASP-2 служать як контроль фону. Аліквоти супернатантів гібридом, або очищених анти-MASP-2 моАт з різними концентраціями в блокуючому розчині додають в ямки. Після інкубації протягом 2 год. при кімнатній температурі ямки інтенсивно промивають PBS. Зв'язані з MASP-2 анти-MASP-2 моАт виявляють шляхом додавання кон'югованих з пероксидазою антитіл проти IgG миші (Sigma Chemical) в блокуючому розчині, які залишають для інкубації на 1 год. при кімнатній температурі. Планшети знову інтенсивно промивають PBS і додають 100 мкл субстрату 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцію TMB гасять додаванням 100 мкл 1 М фосфорної кислоти, і показання з планшетів знімають при 450 нм на планшетному рідері (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Культуральні супернатанти з ямок з позитивними результатами потім тестують на здатність до інгібування активації комплементу в функціональному аналізі, такому як аналіз розщеплення C4, описаний в прикладі 2. Клітини в ямках з позитивними результатами потім клонують методом лімітуючого розведення. моАт знову тестують на здатність до реагування з hMASP-2 в аналізі ELISA, описаному вище. Вибрані гібридами вирощують у обертових колбах і відпрацьований культуральний супернатант збирають для очищення антитіла афінною хроматографією на білку А.

Приклад 6

У даному прикладі описане створення і продукування гуманізованих мишачих анти-MASP-2 антитіл і фрагментів антитіл.

Мишаче анти-MASP-2 моноклональне антитіло отримують, імунізуючи самців мишей A/J, як описано в прикладі 5. Потім проводять гуманізацію мишачого антитіла, як описано нижче, для зменшення його імуногенності за рахунок заміни константних областей мишачого антитіла їх людськими аналогами, отримуючи химерне IgG і Fab-фрагмент антитіла, який може бути використаний для інгібування несприятливих ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єктів-людей відповідно до даного винаходу.

1. Клонування генів варіабельної ділянки анти-MASP-2 з мишачих клітин гібридом.

Сумарну РНК виділяють з клітин гібридом, які секретують анти-MASP-2 моАт (отриманих, як описано в прикладі 7), з використанням RNeasy відповідно до протоколу виробника (Biotec, Houston, Tex.). Перший ланцюг кДНК синтезують з сумарної РНК з використанням оліго(дТ) як праймери. ПЛР проводять з використанням 3'-праймерів, отриманих з константної С-ділянки імуноглобуліну, і наборів вироджених праймерів, отриманих з генів лідерного пептиду або першої каркасної ділянки мишачих VH або VK, як 5'-праймери. Заякорену ПЛР проводять, як описано в публікації Chen and Platsucas (Chen, P.F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992). Для клонування гена VK отримують дволанцюжкову кДНК з використанням праймера NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Випалені адаптори AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) і AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) лігують на обох 5' і 3' кінцях дволанцюжкової кДНК. Адаптори на 3'-кінцях видаляють розщепленням NotI. Продукт розщеплення потім використовують як матрицю в ПЛР з олігонуклеотидом AD1 як 5'-праймер і MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41) як 3'-праймер. Фрагменти ДНК розміром приблизно 500 п. н. клонують в pUC19. Відбирають декілька клонів для аналізу послідовності з метою підтвердження, що клонована послідовність включає очікувану константну область мишачого імуноглобуліну. Олігонуклеотиди NotI-MAK1 і MAK2 отримані з ділянки VK і розташовані на 182 і 84 п.н., відповідно, нижче від першої пари нуклеотидів гена С каппа. Вибирають клони, що містять повну VK і лідерний пептид.

Для клонування гена VH отримують дволанцюжкову кДНК з використанням праймера NotI MAG1 (5'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Випалені адаптори AD1 і AD2 лігують на обох 5' і 3' кінцях дволанцюжкової кДНК. Адаптори на 3'-кінцях видаляють розщепленням NotI. Продукт розщеплення потім використовують як матрицю в ПЛР з олігонуклеотидом AD1 і MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) як

праймери. Фрагменти ДНК довжиною 500-600 п. н. клонують в pUC19. Олігонуклеотиди NotI-MAG1 і MAG2 отримані з ділянки мишачого гена C γ 7.1 і розташовані на 180 і 93 п. н., відповідно, нижче від першої п.н. мишачого гена C γ 7.1. Вибирають клони, що містять повну VH і лідерний пептид.

5 2. Конструювання експресійних векторів для химерних анти-MASP-2 IgG і Fab.

Клоновані гени VH і VK, описані вище, використовують як матриці в реакції ПЛР для додавання консенсусної послідовності Козак до 5'-кінця, і сайту донора сплайсингу до 3'-кінця, нуклеотидної послідовності. Після аналізу послідовностей для підтвердження відсутності помилок ПЛР гени VH і VK вставляють в експресійні векторні касети, що містять людські C γ 1 і C κ каппа, відповідно, отримуючи pSV2neoVH-huC γ 1 і pSV2neoV-huC κ . Очищені в градієнті CsCl плазмідні ДНК векторів важкого і легкого ланцюгів використовують для трансфікування клітин COS методом електропорації. Через 48 годин культуральний супернатант тестують методом ELISA для підтвердження присутності приблизно 200 нг/мл химерних IgG. Клітини збирають і отримують сумарну РНК. Перший ланцюг кДНК синтезують з сумарної РНК, використовуючи оліго(дТ) як праймер. Цю кДНК використовують як матрицю в ПЛР, з отриманням фрагментів ДНК Fd і каппа-ланцюга. Для гена Fd ПЛР проводять з використанням 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO: 44) як 5'-праймер і отриманий з CH1 3'-праймер (5'-CGGGATCCTCAAACCTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45). Підтверджують, що послідовність ДНК містить повний домен VH і домен CH1 людського IgG1. Після розщеплення належними ферментами фрагменти ДНК Fd вставляють в сайти рестрикції HindIII і BamHI експресійної векторної касети pSV2dhfr-TUS, отримуючи pSV2dhfrFd. Плазміда pSV2 комерційно доступна і складається з сегментів ДНК з різних джерел: ДНК pBR322 (тонка лінія) містить точку початку реплікації ДНК pBR322 (pBR ori) і генів лактамази, що додає стійкості до ампіциліну (Amp); ДНК SV40, представлена більш широкою штриховкою і відмічена, містить точку початку реплікації ДНК SV40 (SV40 ori), ранній промотор (в 5'-напрямку від генів dhfr і neo) і сигнал поліаденілювання (в 3'-напрямку від генів dhfr і neo). Сигнал поліаденілювання (pA) з SV40 також вміщений на 3'-кінці гена Fd.

Для гена каппа-ланцюга ПЛР проводять з використанням 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) як 5'-праймер і отриманий з CK 3'-праймер (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Підтверджують, що послідовність ДНК містить повні ділянки VK і CK людського імуноглобуліну. Після розщеплення належними ферментами фрагменти ДНК каппа-ланцюга вставляють в сайти рестрикції HindIII і BamHI експресійної векторної касети pSV2neo-TUS, отримуючи pSV2neoK. Експресія обох генів Fd і каппа-ланцюга знаходиться під контролем елементів енхансера і промотору з HCMV. Оскільки ген Fd не містить кодон для амінокислотного залишку цистеїну, залученого до міжланцюжкового дисульфідного зв'язку, цей рекомбінантний химерний Fab містить нековалентно зв'язані важкі і легкі ланцюги. Цей химерний Fab позначений cFab.

Для отримання рекомбінантного Fab з дисульфідним зв'язком між важким і легким ланцюгами вищезгаданий ген Fd може бути збільшений для включення кодувочої послідовності для додаткових 9 амінокислот (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 48) з шарнірної області людського IgG1. Сегмент ДНК BstEII-BamHI, що кодує 30 амінокислот на 3'-кінці гена Fd може бути замінений сегментами ДНК, що кодують збільшений Fd, з отриманням pSV2dhfrFd/9aa.

3. Експресія і очищення химерного анти-MASP-2 IgG

Для отримання ліній клітин, які секретують химерне анти-MASP-2 IgG, клітини NSO трансфікують очищеними плазмідними ДНК pSV2neoVH-huC γ 1 і pSV2neoV-huC κ каппа методом електропорації. Трансфіковані клітини відбирають в присутності 0,7 мг/мл G418. Клітини вирощують в 250-мл обертових колбах, використовуючи безсироваткове середовище.

Культуральний супернатант з 100 мл культури з обертової колби наносять на 10-мл колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). Колонку промивають 10 об'ємами шару PBS. Антитіло, що зв'язалося, елюють 50 мМ цитратним буфером, pH 3,0. Однаковий об'єм 1 М Hepes, pH 8,0, додають у фракцію, що містить очищене антитіло, для доведення pH до 7,0. Залишкові солі видаляють шляхом заміни буфера на PBS методом ультрафільтрації на мембрані Millipore (пори відсікання по MM: 3000). Білкову концентрацію очищеного антитіла визначають методом BCA (Pierce).

55 4. Експресія і очищення химерних анти-MASP-2 Fab

Для отримання ліній клітин, які секретують химерні анти-MASP-2 Fab, клітини CHO трансфікують очищеними плазмідними ДНК pSV2dhfrFd (або pSV2dhfrFd/9aa) і pSV2neокаппа, методом електропорації. Трансфіковані клітини відбирають в присутності G418 і метотрексату. Відібрані лінії клітин розмножують при зростаючих концентраціях метотрексату. Клітини субклонують одиночними клітинами, використовуючи метод лімітуючого розведення. Потім

продукуючі на високому рівні, клоновані одиночними клітинами клітинні лінії вирощують в 100-мл обертових колбах, використовуючи безсироваткове середовище.

Химерні анти-MASP-2 Fab очищують афінною хроматографією з використанням мишачого антиідіотипічного моАт до анти-MASP-2 моАт. Антиідіотипічне моАт до анти-MASP-2 моАт можна отримувати шляхом імунізації мишей мишачим анти-MASP-2 моАт, кон'югованим з гемоціаніном морського блюдця (KLH), і проведення скринінгу на специфічно зв'язуюче моАт, яке може конкурувати з людським MASP-2. Для очищення 100 мл супернатанта з клітин, що культивуються у обертових колбах CHO, які продукують сFab або сFab/9aa, наносять на афінну колонку зі зв'язаним антиідіотипічним моАт до анти-MASP-2 моАт. Потім колонку ретельно промивають PBS, після чого Fab, що зв'язалися, елюють 50 мМ діетиламіном рН 11,5. Залишкові солі видаляють шляхом заміни буфера, як описано вище. Білкову концентрацію очищених Fab визначають методом BCA (Pierce).

Здатність химерних анти-MASP-2 IgG, сFab і сFab/9aa інгібувати MASP-2-залежні шляхи комплементу можна визначати в аналізах інгібування, описаних в прикладі 2 або прикладі 7.

Приклад 7

У даному прикладі описаний *in vitro* аналіз розщеплення C4, що використовується для функціонального скринінгу з метою ідентифікації інгібуючих MASP-2 засобів, здатних блокувати MASP-2-залежну активацію комплементу через L-фіколін/P35, H-фіколін, M-фіколін або манан.

Аналіз розщеплення C4

Аналіз розщеплення C4 описаний в публікації Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001, в аналізі вимірюють активацію лектинового шляху, виникаючу в результаті зв'язування ліпотейхоєвої кислоти (LTA) з *S. aureus* з L-фіколіном.

Реагенти

Фіксовану в формаліні *S. aureus* (DSM20233) отримують таким чином: бактерії вирощують протягом ночі при 37 °C в триптичному соєвому кров'яному середовищі, промивають три рази PBS, потім фіксують протягом 1 год. при кімнатній температурі в суміші PBS/0,5 % формалін, і промивають ще три рази PBS, з подальшим ресуспендуванням в буфері для нанесення (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, рН 9,6).

Аналіз

Ямки планшета для мікротитрування Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покривають: 100 мкл фіксованої в формаліні *S. aureus* DSM20233 (OD₅₅₀=0,5) в буфері для нанесення з 1 мкг L-фіколіну в буфері для нанесення. Після інкубації протягом ночі ямки блокують 0,1 % розчином людського сироваткового альбуміну (HSA) в TBS (10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, рН 7,4), потім промивають TBS, що містить 0,05 % Tween 20 і 5 мМ CaCl₂ (промивальний буфер). Зразки людської сироватки розбавляють буфером 20 мМ Tris-HCl, 1 М NaCl, 10 мМ CaCl₂, 0,05 % Triton X-100, 0,1 % HSA, рН 7,4, який запобігає активації ендogenous C4 і викликає дисоціацію комплексу C1 (що складається з C1q, C1r і C1s). Інгібуючі MASP-2 засоби, включаючи анти-MASP-2 моАт і інгібуючі пептиди, додають до зразків сироватки в різних концентраціях. Розбавлені зразки додають в планшет і інкубують протягом ночі при 4 °C. Через 24 години планшети ретельно промивають промивальним буфером, потім в кожен ямку додають 0,1 мкг очищеного людського C4 (отриманого як описано в Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл розчину 4 мМ барбіталу, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, рН 7,4. Через 1,5 год. при 37 °C планшети знову промивають, відкладення C4b виявляють з використанням кон'югованих з лужною фосфатазою курячих антитіл проти людського C4c (отриманих від компанії Immunsystem, Uppsala, Sweden) і вимірюють з використанням колориметричного субстрату p-нітрофенілфосфату.

Аналіз C4 на манані

Аналіз, описаний вище, адаптують для вимірювання активації лектинового шляху через MBL шляхом нанесення на планшет LSP і манану, з подальшим доданням сироватки, змішаної з різними інгібуючими MASP-2 засобами.

Аналіз C4 на H-фіколіні (Ag Hakata)

Аналіз, описаний вище, адаптують для вимірювання активації лектинового шляху через H-фіколін шляхом нанесення на планшет LSP і H-фіколіну, з подальшим доданням сироватки, змішаної з різними інгібуючими MASP-2 засобами.

Приклад 8

Наступний аналіз демонструє наявність класичного шляху активації у мишей дикого типу і MASP-2-/-.

Методи

Імунні комплекси отримували *in situ* шляхом нанесення на планшети для мікротитрування (Maxisorb, Nunc, каталожний № 442404, Fisher Scientific) 0,1 % людського сироваткового

альбуміну в 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, pH 7,4, на 1 годину при кімнатній температурі, з подальшою інкубацією протягом ночі при 4 °C з імунною сироваткою вівці проти цільної сироватки (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland), розведеної 1:1000 в TBS/Tween/Ca²⁺. Зразки сироватки отримували від мишей дикого типу і MASP-2/- і додавали в покриті ямки планшета. Готували контрольні зразки, в яких C1q був виснажений із зразків сироватки дикого типу і MASP-2/-/. Виснажену по C1q мишачу сироватку отримували з використанням зв'язаних з білком А гранул Dynabeads (Dynal Biotech, Oslo, Norway), покритих кролячими IgG проти людського C1q (Dako, Glostrup, Denmark), відповідно до інструкцій постачальника. Планшети інкубували протягом 90 хвилин при 37 °C. Зв'язаний C3b виявляли за допомогою поліклональних антитіл проти людського C3c (Dako A 062), розведених 1:1000 в TBS/Tween/Ca⁺⁺. Вторинне антитіло являло собою антитіло кози проти IgG кролика.

Результати

На ФІГУРІ 7 показані відносні рівні відкладення C3b на планшетах, покритих IgG, в сироватці дикого типу, сироватці MASP-2/-/, виснаженій по C1q сироватці дикого типу і виснаженій по C1q сироватці MASP-2/-/. Ці результати демонструють, що класичний шлях є інтактним у мишей лінії MASP-2/-/.

Приклад 9

Наступний аналіз використовують для тестування того, чи блокує інгібуючий MASP-2 засіб класичний шлях, шляхом аналізу ефекту інгібуючого MASP-2 засобу в умовах, в яких відбувається ініціація класичного шляху імунними комплексами.

Методи

Для тестування ефекту інгібуючого MASP-2 засобу на умови активації комплементу, в яких класичний шлях ініціюється імунними комплексами, 50-мкл зразки в трьох повторях, які містять 90 % НЛС, інкубують при 37 °C в присутності 10 мкг/мл імунного комплексу (IC) або PBS, і також паралельно тестують в трьох повторях зразки (+/- IC), які містять 200 нМ моноклональне антитіло проти пропердину, в процесі інкубації при 37 °C. Через два часи інкубації при 37 °C до всіх зразків додають 13 мМ ЕДТА для зупинки подальшої активації комплементу, і зразки негайно охолоджують до 5 °C. Потім зразки зберігають при -70 °C до проведення аналізу на продукти активації комплементу (C3a і sC5b-9) з використанням наборів для ELISA (Quidel, каталожні №№ A015 і A009) відповідно до інструкцій виробника.

Приклад 10

У даному прикладі описана ідентифікація високоафінних анти-MASP-2 Fab2-фрагментів антитіла, які блокують активність MASP-2.

Передумови і обґрунтування

MASP-2 являє собою складний білок з множиною окремих функціональних доменів, включаючи: сайт(i) зв'язування для MBL і фіколінів, каталітичний центр серинової протеази, сайт зв'язування для протеолітичного субстрату C2, сайт зв'язування для протеолітичного субстрату C4, сайт розщеплення MASP-2 для аутоактивації зимогену MASP-2 і два сайти зв'язування Ca⁺⁺. Були ідентифіковані Fab2-фрагменти антитіла, які зв'язують з високою афінністю MASP-2, і ідентифіковані Fab2-фрагменти були протестовані в функціональному аналізі для визначення того, чи здатні вони блокувати функціональну активність MASP-2.

Для блокування функціональної активності MASP-2 антитіло або Fab2-фрагмент антитіла повинні зв'язувати і блокувати структурний епітоп на MASP-2, який необхідний для функціональної активності MASP-2. Таким чином, багато, або всі, з анти-MASP-2 Fab2-фрагментів, що зв'язуються з високою афінністю, можуть не інгібувати функціональну активність MASP-2, якщо тільки вони не зв'язують структурні епітопи на MASP-2, які безпосередньо залучені до функціональної активності MASP-2.

Функціональний аналіз, що дозволяє вимірювати інгібування утворення C3-конвертази лектинового шляху, використовували для оцінки "блокуючої активності" анти-MASP-2 Fab2. Відомо, що основна фізіологічна роль MASP-2 в лектиновому шляху полягає в створенні наступного функціонального компонента опосередкованого лектином шляху комплементу, а саме, C3-конвертази лектинового шляху. C3-конвертаза лектинового шляху є важливим ферментативним комплексом (C4bC2a), який протеолітично розщеплює C3 на C3a і C3b. MASP-2 не є структурним компонентом C3-конвертази лектинового шляху (C4bC2a); однак функціональна активність MASP-2 необхідна для створення двох білкових компонентів (C4b, C2a), які складають C3-конвертазу лектинового шляху. Більше того, всі з окремих функціональних активностей MASP-2, перерахованих вище, судячи з усього, необхідні MASP-2 для створення C3-конвертази лектинового шляху. З цієї причини переважним аналізом для оцінки "блокуючої активності" анти-MASP-2 Fab2 вважається функціональний аналіз, в якому вимірюють інгібування утворення C3-конвертази лектинового шляху.

Отримання високоафінних Fab2

Бібліотеку фагового дисплея послідовностей варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів людського антитіла і автоматизовану технологію відбору антитіл для ідентифікації Fab2, реагуючих з вибраними цікавлячими лігандами, використовували для отримання високоафінних Fab2 до щурячого білка MASP-2 (SEQ ID NO: 55). Відому кількість щурячого білка MASP-2 (~1 мг, чистота >85 %) використовували для скринінгу антитіл. Використовували три раунди ампліфікації для відбору антитіл з найкращою афінністю. Приблизно 250 різних "успішних знахідок", які експресують фрагменти антитіла, були відібрані для скринінгу методом ELISA. "Успішні знахідки" з високою афінністю згодом були секвеновані для визначення унікальності різних антитіл.

П'ятдесят унікальних анти-MASP-2 антитіл були очищені, і 250 мкг кожного очищеного Fab2 антитіла використовували для визначення характеристик афінності зв'язування MASP-2 і функціонального тестування шляху комплементу, як описано більш детально нижче.

Аналізи, що використовуються для оцінки інгібуючої (блокуючої) активності анти-MASP-2 Fab2

1. Аналіз для визначення інгібування утворення C3-конвертази лектинового шляху:

Передумови

C3-конвертаза лектинового шляху являє собою ферментативний комплекс (C4bC2a), який протеолітично розщеплює C3 на два сильні прозапальні фрагменти, анафілатоксин C3a і опсонін C3b. Утворення C3-конвертази, судячи з усього, є ключовим етапом в лектиновому шляху для медіації запалення. MASP-2 не є структурним компонентом C3-конвертази лектинового шляху (C4bC2a); таким чином, анти-MASP-2 антитіла (або Fab2) не будуть безпосередньо інгібувати активність раніше існуючої C3-конвертази. Однак активність серинової протеази MASP-2 необхідна для утворення двох білкових компонентів (C4b, C2a), які складають C3-конвертазу лектинового шляху. Внаслідок цього, анти-MASP-2 Fab2, яке інгібує функціональну активність MASP-2 (тобто, блокуюче анти-MASP-2 Fab2) буде інгібувати *de novo* утворення C3-конвертази лектинового шляху. C3 містить незвичайну і високо реакційноздатну тіоефірну групу в своїй структурі. Після розщеплення C3 C3-конвертазою в цьому аналізі тіоефірна група на C3b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок за рахунок складноефірних або амідних зв'язків, це полегшує виявлення C3b в аналізі ELISA.

Дріжджовий манан є відомим активатором лектинового шляху. У наступному способі вимірювання утворення C3-конвертази пластикові ямки, покриті мананом, інкубували протягом 30 хв при 37 °C з розбавленою щурячою сироваткою для активації лектинового шляху. Потім ямки промивали і аналізували на C3b, іммобілізований в ямках, стандартними методами ELISA. Кількість C3b, що утворився в даному аналізі, напряду відображає *de novo* утворення C3-конвертази лектинового шляху. Анти-MASP-2 Fab2 у вибраних концентраціях тестували в даному аналізі на їх здатність інгібувати утворення C3-конвертази і подальшу утворення C3b.

Методи

96-ямкові планшети із середнім ступенем зв'язування Costar інкубували протягом ночі при 5 °C з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері, pH 9,5, нанесеному в кількості 1 мкг/50 мкл/ямку. Після інкубації протягом ночі кожну ямку промивали три рази по 200 мкл PBS. Потім ямки блокували по 100 мкл/ямку 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну в PBS і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Потім кожну ямку промивали три рази по 200 мкл PBS. Зразки анти-MASP-2 Fab2 розбавляли до вибраних концентрацій буфером GVB, що містить Ca⁺⁺ і Mg⁺⁺ (4,0 мМ барбітал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl₂, 2,0 мМ CaCl₂, 0,1 % желатин, pH 7,4), при 5 °C. До вищезгаданих зразків при 5 °C додавали 0,5 % щурячу сироватку, і 100 мкл переносили в кожну ямку. Планшети накривали і інкубували протягом 30 хвилин у водяній бані при 37 °C для активації комплементу. Реакцію зупиняли перенесенням планшетів з водяної бані з температурою 37 °C в контейнер, що містить суміш льоду з водою. Кожну ямку промивали п'ять разів по 200 мкл PBS-Tween 20 (0,05 % Tween 20 в PBS), потім промивали два рази по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку розведене 1:10000 первинне антитіло (антитіло кролика проти людського C3c, DAKO A0062) в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, і інкубували 1 годину при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 5×200 мкл PBS. Додавали 100 мкл/ямку розведеного 1:10000 вторинного антитіла (кон'юговане з пероксидазою антитіло кози проти IgG кролика, American Qualex A102PU) в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі на шейкері з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали п'ять разів по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку субстрат пероксидази TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)

і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Реакцію пероксидази зупиняли доданням по 100 мкл/ямку 1,0 М H_3PO_4 і вимірювали OD_{450} .

2. Аналіз для вимірювання інгібування MASP-2-залежного розщеплення C4

Передумови

Активність серинової протеази MASP-2 є високоспецифічною, і були ідентифіковані лише два білкові субстрати для MASP-2; C2 і C4. Розщеплення C4 приводить до утворення C4a і C4b. Анти-MASP-2 Fab2 може зв'язувати структурні епітопи на MASP-2, які безпосередньо беруть участь в розщепленні C4 (наприклад, сайт зв'язування MASP-2 для C4; каталітичний центр серинової протеази MASP-2), і за рахунок цього інгібувати функціональну активність розщеплення C4 у MASP-2.

Дріжджовий манан є відомим активатором лектинового шляху. У наступному способі вимірювання активності розщеплення C4 MASP-2 пластикові ямки, покриті мананом, інкубували протягом 30 хв при 37 °C з розбавленою щурячою сироваткою для активації лектинового шляху. Оскільки первинне антитіло, що використовується в даному аналізі ELISA, впізнає лише людський C4, в розбавлену щурячу сироватку також додавали людський C4 (1,0 мкг/мл). Потім ямки промивали і аналізували на людський C4b, іммобілізований в ямках, стандартними методами ELISA. Кількість C4b, що утворилася в даному аналізі, є ступенем MASP-2-залежної активності розщеплення C4. Анти-MASP-2 Fab2 у вибраних концентраціях тестували в даному аналізі на його здатність інгібувати розщеплення C4.

Методи

96-ямкові планшети із середнім ступенем зв'язування Costar інкубували протягом ночі при 5 °C з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері, pH 9,5, нанесеному в кількості 1 мкг/50 мкл/ямку. Кожну ямку промивали 3X по 200 мкл PBS. Потім ямки блокували по 100 мкл/ямку 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну в PBS і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Потім кожну ямку промивали 3X по 200 мкл PBS. Зразки анти-MASP-2 Fab2 розбавляли до вибраних концентрацій буфером GVB, що містить Ca^{++} і Mg^{++} (4,0 мМ барбітал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl_2 , 2,0 мМ CaCl_2 , 0,1 % желатин, pH 7,4), при 5 °C. У ці зразки також включали 1,0 мкг/мл людського C4 (Quidel). До вищезгаданих зразків при 5 °C додавали 0,5 % щурячу сироватку, і 100 мкл переносили в кожну ямку. Планшети накривали і інкубували протягом 30 хвилин у водяній бані при 37 °C для активації комплекменту. Реакцію зупиняли перенесенням планшетів з водяної бані з температурою 37 °C в контейнер, що містить суміш льоду з водою. Кожну ямку промивали 5X по 200 мкл PBS-Tween 20 (0,05 % Tween 20 в PBS), потім промивали два рази по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку розведене 1:700 кон'юговане з біотином куряче антитіло проти людського C4c (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA), і інкубували одну годину при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 5X по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку кон'югованого з пероксидазою стрептавідину в концентрації 0,1 мкг/мл (Pierce Chemical №21126) в PBS, що містить 2,0 мг/мл BSA, і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі на шейкері з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 5X по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку субстрату пероксидази TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) і інкубували при кімнатній температурі протягом 16 хв. Реакцію пероксидази зупиняли доданням по 100 мкл/ямку 1,0 М H_3PO_4 і вимірювали OD_{450} .

3. Аналіз зв'язування Fab2 проти щурячого MASP-2 з "природним" щурячим MASP-2

Передумови

MASP-2, як правило, присутній в плазмі у вигляді димерного комплексу MASP-2, який також включає специфічні молекули лектину (маноза-зв'язувальний білок (MBL) і фіколіні). Таким чином, якщо стоїть задача вивчення зв'язування анти-MASP-2 Fab2 з фізіологічною формою MASP-2, важливо розробити аналіз зв'язування, в якому використовується взаємодія між Fab2 і "природним" MASP-2 в плазмі, а не очищений рекомбінантним MASP-2. У даному аналізі зв'язування "природний" комплекс MASP-2-MBL з 10 % щурячої сироватки спочатку іммобілізували на покритих мананом ямках. Потім вивчали афінність зв'язування різних анти-MASP-2 Fab2 з іммобілізованим "природним" MASP-2 стандартним методом ELISA.

Методи

96-ямкові планшети з високим ступенем зв'язування Costar інкубували протягом ночі при 5 °C з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері, pH 9,5, нанесеному в кількості 1 мкг/50 мкл/ямку. Кожну ямку промивали 3X по 200 мкл PBS. Потім ямки блокували по 100 мкл/ямку 0,5 % розчином нежирного сухого молока в PBST (PBS з 0,05 % Tween 20) і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 3X по 200 мкл промивального буфера TBS/Tween/ Ca^{++} (Tris-буферний сольовий

розчин, 0,05 % Tween 20, що містить 5,0 мМ CaCl₂, рН 7,4). Готували на льоду 10 % щурячу сироватку в буфері для зв'язування з високим вмістом солі (20 мМ Tris, 1,0 М NaCl, 10 мМ CaCl₂, 0,05 % Triton-X100, 0,1 % (мас./об.) бичачого сироваткового альбуміну, рН 7,4). Додавали по 100 мкл/ямку і інкубували протягом ночі при 5 °С. Потім ямки промивали 3X по 200 мкл промивального буфера TBS/Tween/Ca⁺⁺. Після цього ямки промивали 2X по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку анти-MASP-2 Fab2 у вибраних концентраціях, розведені в буфері GVB, який містить Ca⁺⁺ і Mg⁺⁺ (4,0 мМ барбітал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl₂, 2,0 мМ CaCl₂, 0,1 % желатин, рН 7,4), і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 5X по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку HRP-кон'юговане антитіло кози проти Fab2 (Biogenesis, каталожний № 0500-0099), розведене 1:5000 в 2,0 мг/мл розчині бичачого сироваткового альбуміну в PBS, і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Кожну ямку промивали 5X по 200 мкл PBS. Додавали по 100 мкл/ямку субстрату пероксидази TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) і інкубували при кімнатній температурі протягом 70 хв. Реакцію пероксидази зупиняли доданням по 100 мкл/ямку 1,0 М H₃PO₄ і вимірювали OD₄₅₀.

Результати

Приблизно 250 різних Fab2, які реагували з високою афінністю з щурячим білком MASP-2, були відібрані для скринінгу методом ELISA. Ці високоафінні Fab2 були секвензовані для визначення унікальності різних антитіл, і 50 унікальних анти-MASP-2 антитіл були очищені для подальшого аналізу. По 250 мкг кожного очищеного Fab2 антитіла використовували для визначення характеристик афінності зв'язування MASP-2 і функціонального тестування шляху комплементу. Результати даного аналізу наведені в ТАБЛИЦІ 6.

Таблиця 6:

АНТИ-MASP-2 FAB2, ЯКІ БЛОКУЮТЬ ЛЕКТИНОВИЙ ШЛЯХ АКТИВАЦІЇ КОМПЛЕМЕНТУ

Fab2 антитіло №	C3-Конвертаза (IC ₅₀ (нМ))	K _D	Розщеплення C4 IC ₅₀ (нМ)
88	0,32	4,1	Н/О
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	Н/О
81	0,54	2,0	Н/О
66	0,92	4,5	Н/О
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	Н/О
60	1,6	3,1	Н/О
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	Н/О
49	2,8	8,5	<2 нМ
89	3,0	2,5	Н/О
71	3,0	10,5	Н/О
87	6,0	2,5	Н/О
67	10,0	7,7	Н/О

Як показано вище в ТАБЛИЦІ 6, з 50 протестованих анти-MASP-2 Fab2 були ідентифіковані сімнадцять Fab2 як блокуючих MASP-2 Fab2, які потенційно інгібують утворення C3-конвертази з величиною IC₅₀, яка дорівнює або менша ніж 10 нМ Fab2 (коефіцієнт позитивних успішних знахідок 34 %). Вісім з сімнадцяти ідентифікованих Fab2 мають величину IC₅₀ в субнаномольному діапазоні. Більше того, всі сімнадцять з блокуючих MASP-2 Fab2, наведених в ТАБЛИЦІ 6, забезпечують практично повне інгібування утворення C3-конвертази в аналізі на утворення C3-конвертази лектинового шляху. На ФІГУРІ 8А наведений графік, що показує результати аналізу утворення C3-конвертази для Fab2 антитіла № 11, яке є репрезентативним для інших протестованих Fab2 антитіл, результати для яких наведені в ТАБЛИЦІ 6. Це є важливим міркуванням, оскільки теоретично можливо, що "блокуючі" Fab2 можуть лише частково інгібувати функцію MASP-2, навіть, коли кожна молекула MASP-2 зв'язана з Fab2.

Хоча манан є відомим активатором лектинового шляху, теоретично можливо, що наявність антитіла до манану в щурячій сироватці також може активувати класичний шлях і приводити до

утворення C3b через C3-конвертазу класичного шляху. Однак кожне з сімнадцяти блокуючих анти-MASP-2 Fab2, перерахованих в даному прикладі, сильно інгібує утворення C3b (>95 %), тим самим свідчаючи про специфічність даного аналізу для C3-конвертази лектинового шляху.

Аналізи зв'язування також проводили з всіма сімнадцятьма блокуючими Fab2 для розрахунку позірної K_d для кожного з них. Результати аналізів зв'язування Fab2 проти щурячого MASP-2 з природним щурячим MASP-2 для шести з блокуючих Fab2 також наведені в ТАБЛИЦІ 6. На ФІГУРІ 8В наведений графік, що показує результати аналізу зв'язування з Fab2 антитілом № 11. Аналогічні аналізи зв'язування також проводили для інших Fab2, і ці результати наведені в ТАБЛИЦІ 6. Як правило, величини позірної K_d , отримані для зв'язування кожного з шести Fab2 з "природним" MASP-2, досить добре узгодяться з IC_{50} для конкретних Fab2 в функціональному аналізі для C3-конвертази. Існує доказ того, що MASP-2 зазнає конформаційних змін з "неактивної" в "активну" форму при активації його протеазної активності (Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). В нормальній щурячій плазмі, що використовується в аналізі утворення C3-конвертази, MASP-2 присутній переважно в "неактивній" конформації зимогену. Навпаки, в аналізі зв'язування MASP-2 присутній у вигляді частини комплексу з MBL, зв'язаного з іммобілізованим мананом; таким чином, MASP-2 знаходиться в "активній" конформації (Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). Отже, не обов'язково чекати точної відповідності між IC_{50} і K_d для кожного з сімнадцяти протестованих блокуючих Fab2 в цих двох функціональних аналізах, оскільки в кожному аналізі Fab2 зв'язують різні конформаційні форми MASP-2. Проте, за винятком Fab2 № 88, ймовірно, має місце досить близька відповідність між IC_{50} і позірною K_d для кожного з інших Fab2, протестованих в цих двох аналізах (дивись ТАБЛИЦЮ 6).

Декілька блокуючих Fab2 були протестовані на інгібування опосередкованого MASP-2 розщеплення C4. На ФІГУРІ 8С наведений графік, що показує результати аналізу розщеплення C4, що демонструють інгібування Fab2 № 41, з $IC_{50}=0,81$ нМ (дивись ТАБЛИЦЮ 6). Як показано на ФІГУРІ 9, всі з протестованих Fab2 інгібували розщеплення C4 з величинами IC_{50} , аналогічними тим, які отримані в аналізі для C3-конвертази (дивись ТАБЛИЦЮ 6).

Хоча манан є відомим активатором лектинового шляху, теоретично можливо, що наявність антитіл до манану в щурячій сироватці також може активувати класичний шлях і приводити до утворення C4b за рахунок C1s-опосередкованого розщеплення C4. Однак було ідентифіковано декілька анти-MASP-2 Fab2, які сильно інгібують утворення C4b (>95 %), тим самим свідчаючи про специфічність даного аналізу для опосередкованого MASP-2 розщеплення C4. C4, подібно до C3, містить незвичайну і високо реакційноздатну тіоефірну групу в своїй структурі. Після розщеплення C4 за рахунок MASP-2 в даному аналізі тіоефірна група на C4b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок за рахунок складноефірних або амідних зв'язків, це полегшує виявлення C4b в аналізі ELISA.

Результати даних досліджень чітко показують, що отримані високоафінні Fab2 до щурячого білка MASP-2, які функціонально блокують як розщеплення C4, так і активність C3-конвертази, тим самим запобігаючи лектиновий шлях активації.

Приклад 11

У даному прикладі описане картування епітопів для декількох блокуючих Fab2 антитіл проти щурячого MASP-2, які були отримані, як описано в Прикладі 10.

Методи

Як показано на ФІГУРІ 10, наступні білки, всі з N-кінцевими 6X His-мітками, були експресовані в клітинах CHO за допомогою вектора pED4:

щурячий MASP-2A, повнорозмірний білок MASP-2, інактивований шляхом заміни серину в активному центрі на аланін (S613A);

щурячий MASP-2K, повнорозмірний білок MASP-2, модифікований для зменшення аутоактивації (R424K);

CUBI-II, N-кінцевий фрагмент щурячого MASP-2, який містить тільки домени CUBI, EGF-подібний і CUBII; і

CUBI/EGF-подібний, N-кінцевий фрагмент щурячого MASP-2, який містить тільки домени CUBI і EGF-подібний.

Ці білки очищали з культуральних супернатантів афінною хроматографією на колонці з нікелем, як описано раніше (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

C-кінцевий поліпептид (CCPII-SP), що містить CCPII і домен серинової протеази щурячого MASP-2, був експресований в *E. coli* у вигляді злитого білка з тіоредоксином з використанням pTrxFus (Invitrogen). Білок очищали з клітинних лізатів з використанням афінної смоли Thiobond. Партнер по злиттю тіоредоксин був експресований з пустого pTrxFus як негативний контроль.

Всі рекомбінантні білки діалізували в буфері TBS, і їх концентрації визначали шляхом вимірювання OD при 280 нм.

Дот-блот аналіз

П'ять рекомбінантних поліпептидів MASP-2, описаних вище і представлених на ФІГУРІ 10, в серійному розведенні (і поліпептид тіоредоксину як негативний контроль для поліпептиду ССПІІ-серінова протеаза) точково наносили на нітроцелюлозну мембрану. Кількість точково нанесеного білка знаходилася в діапазоні від 100 нг до 6,4 пг, в п'ятикратному розведенні. У більш пізніх експериментах кількість точково нанесеного білка знаходилася в діапазоні від 50 нг до 16 пг, знов-таки, в п'ятикратному розведенні. Мембрани блокували 5 % розчином порошкового нежирного молока в TBS (блокуючий буфер), потім інкубували з анти-MASP-2 Fab2 з концентрацією 1,0 мкг/мл в блокуючому буфері (що містить 5,0 мМ Ca^{2+}). Зв'язані Fab2 виявляли за допомогою HRP-кон'югованих антитіл проти Fab людини (AbD/Serotec; розведення 1/10000) і набору для виявлення ECL (Amersham). Одну мембрану інкубували з поліклональними Ат кролика проти людського MASP-2 (описаними в Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)) як позитивний контроль. У цьому випадку зв'язані Ат виявляли за допомогою HRP-кон'югованих антитіл кози проти IgG кролика (Dako; розведення 1/2000).

Аналіз зв'язування MASP-2

Планшети для ELISA покривали по 1,0 мкг/ямку рекомбінантним поліпептидом MASP-2A або CUBI-II в карбонатному буфері (pH 9,0) протягом ночі при 4 °C. Ямки блокували 1 % BSA в TBS, потім додавали анти-MASP-2 Fab2 в серійному розведенні в TBS, що містить 5,0 мМ Ca^{2+} . Планшети інкубували протягом однієї години при RT. Після трикратного промивання TBS/Tween/ Ca^{2+} додавали HRP-кон'юговані антитіла проти Fab людини (AbD/Serotec), розведені 1/10000 в TBS/ Ca^{2+} , і планшети інкубували протягом ще однієї години при RT. Зв'язане антитіло виявляли з використанням набору з субстратом пероксидази TMB (Biorad).

Результати

Результати дот-блот аналізу, що демонструють здатність Fab2 взаємодіяти з різними поліпептидами MASP-2, наведені нижче в ТАБЛИЦІ 7. Числові значення, наведені в ТАБЛИЦІ 7, показують кількість точково нанесеного білка, необхідну для досягнення приблизно напівмаксимальної сили сигналу. Як показано, всі з поліпептидів (за винятком окремого партнера по злиттю тіоредоксину) були упізнані позитивними контрольними Ат (поліклональна кроляча сироватка проти людського MASP-2).

Таблиця 7:

ЗДАТНІСТЬ ДО ВЗАЄМОДІЇ З РІЗНИМИ РЕКОМБІНАНТНИМИ ПОЛІПЕПТИДАМИ ЩУРЯЧОГО MASP-2 В ДОТ-БЛОТ АНАЛІЗІ

Fab2 Антитіло №	MA SP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-подібний	ССПІІ-SP	Тіоредоксин
40	0,16 нг	Н/Р	Н/Р	0,8 нг	Н/Р
41	0,16 нг	Н/Р	Н/Р	0,8 нг	Н/Р
11	0,16 нг	Н/Р	Н/Р	0,8 нг	Н/Р
49	0,16 нг	Н/Р	Н/Р	>20 нг	Н/Р
52	0,16 нг	Н/Р	Н/Р	0,8 нг	Н/Р
57	0,032 нг	Н/Р	Н/Р	Н/Р	Н/Р
58	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
60	0,4 нг	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	Н/Р
63	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
66	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
67	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
71	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
81	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
86	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	10 нг	Н/Р
87	0,4 нг	Н/Р	Н/Р	2,0 нг	Н/Р
Позитивний контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	Н/Р

Н/Р=немає реакції. Позитивними контрольними антитілами служила поліклональна кроляча сироватка проти людського MASP-2.

Всі з Fab2 взаємодіяли з MASP-2A, а також MASP-2K (дані не представлені). Більшість Fab2

впізнавали поліпептид CCP-II-SP, але не N-кінцеві фрагменти. Двома виключеннями були Fab2 № 60 і Fab2 № 57. Fab2 № 60 впізнавав MASP-2A і фрагмент CUBI-II, але не поліпептид CUBI/EGF-подібний домен або поліпептид CCP-II-SP, це вказує на те, що він зв'язує епітоп в CUBII, або зв'язуючий CUBII і EGF-подібний домен. Fab2 № 57 впізнавав MASP-2A, але жоден з протестованих фрагментів MASP-2, це вказує на те, що цей Fab2 впізнає епітоп в CCP1. Fab2 № 40 і № 49 зв'язували тільки повнорозмірний MASP-2A. У аналізі зв'язування методом ELISA, проілюстрованому на ФІГУРІ 11, Fab2 № 60 також зв'язував поліпептид CUBI-II, хоч і з трохи більш низькою позірною афінністю.

Ці результати показують, що були ідентифіковані унікальні блокуючі Fab2 до декількох ділянок білка MASP-2

Приклад 12

У даному прикладі описаний аналіз мишей MASP-2^{-/-} в мишачій моделі ниркової ішемії/реперфузії.

Передумови/обґрунтування

Ішемічно-реперфузійне (I/R) пошкодження нирок при температурі тіла стосується ряду клінічних станів, включаючи гіповолемічний шок, оклюзію ниркової артерії і процедури перетиснення судин.

Ішемія-реперфузія (I/R) нирок є важливою причиною гострої ниркової недостатності, пов'язаної з рівнем смертності до 50 % (Levy et al., JAMA 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., N. Engl. J. Med. 334:1448-60, 1996). Пост-трансплантаційна ниркова недостатність є поширеним і загрозливим життю ускладненням після трансплантації нирок (Nicholson et al., Kidney Int. 58:2585-91, 2000). Ефективне лікування I/R пошкодження нирок в цей час недоступне, і гемодіаліз є єдиним доступним лікуванням. Патофізіологія I/R пошкодження нирок є складною. Нещодавні дослідження показали, що лектиновий шлях активації комплементу може відігравати важливу роль в патогенезі I/R пошкодження нирок (deVries et al., Am. J. Path. 165:1677-88, 2004).

Методи

Мишей MASP-2^{-/-} отримували, як описано в прикладі 1, і проводили їх зворотне схрещування протягом щонайменше 10 поколінь з C57Bl/6. Шести самцям MASP-2^{-/-} і шести мишам дикого типу (+/+) з масою тіла 22-25 г вводили внутрішньоочеревинною ін'єкцією гіпновел (6,64 мг/кг; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, UK), а потім застосовували анестезію шляхом інгаляції ізофлурану (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK). Ізофлуран був вибраний, оскільки він являє собою м'який інгаляційний анестетик з мінімальною токсичністю для печінки; концентрації дотримуються точно, і тварина відновлюється швидко, навіть після тривалої анестезії. Гіпновел вводили, оскільки він спричиняє стан нейролептаналгезії у тварини, і це означає, що треба вводити менше ізофлурану. Тварину вміщували на теплу підкладку для підтримки постійної температури тіла. Потім виробляли серединний розріз живота і відкривали порожнину тіла за допомогою пари ретракторів. Сполучну тканину видаляли вище і нижче ниркової вени і артерії правої і лівої нирок, і ниркову ніжку затискали за допомогою затискачів для мікроаневризми протягом 55 хвилин. Тривалість цього періоду ішемії спочатку була основана на попередньому дослідженні, проведеному в даній лабораторії (Zhou et al., J. Clin. Invest. 105:1363-71 (2000)). Крім того, стандартний час ішемії 55 хвилин був вибраний після титрування ішемії, при якому було виявлено, що 55 хвилин приводять до стійкого пошкодження, яке також є оборотним, з низькою смертністю, менше 5 %. Після оклюзії 0,4 мл теплового сольового розчину (37 °C) вносили в черевну порожнину, а потім черевну порожнину закривали на період ішемії. Після видалення затискачів для мікроаневризми нирки спостерігали до зміни кольору, що є ознакою повторного притоку крові до нирок. Ще 0,4 мл теплового сольового розчину вносили в черевну порожнину, і отвір зашивали, після чого тварин повертали в їх клітки. Зразки крові з хвостової вени збирали через 24 години після зняття затискачів, а через 48 годин мишей умертвляли і збирали додаткові зразки крові.

Оцінка пошкодження нирок

Ниркову функцію оцінювали через 24 і 48 годин після реперфузії у шести самців мишей MASP-2^{-/-} і шести мишей ДТ (+/+). Визначення креатиніну в крові проводили методом мас-спектрометрії, отримуючи відтворюваний показник ниркової функції (чутливість <1,0 мкмоль/л). На ФІГУРІ 12 графічно представлений кліренс азоту сечовини крові для контролів C57Bl/6 дикого типу і мишей MASP-2^{-/-} через 24 години і 48 годин після реперфузії. Як показано на ФІГУРІ 12, у мишей MASP-2^{-/-} спостерігалось значне зменшення кількості сечовини в крові через 24 і 48 годин, порівняно з контрольними мишами дикого типу, це вказувало на захисний функціональний ефект проти пошкодження нирок в моделі ішемічного-реперфузійного пошкодження.

Загалом збільшення сечовини в крові спостерігалось як у мишей ДТ (+/+), так і у мишей

MASP-2 (-/-), через 24 і 48 годин після хірургічної процедури і ішемічного інсульту. Рівень сечовини в крові у тварини ДТ (+/+) після операції без ішемії, як було визначено окремо, становить 5,8 ммоль/л. Крім даних, представлених на ФІГУРІ 12, у одного тварини MASP-2 (-/-) спостерігали майже повний захист від ішемічного інсульту, з показниками 6,8 і 9,6 ммоль/л через 24 і 48 годин, відповідно. Ця тварина була виключена з групового аналізу, як потенційний аномальний результат, при якому ішемічне пошкодження могло бути відсутнім. Таким чином, в остаточний аналіз, результати якого представлені на ФІГУРІ 12, були включені 5 мишей MASP-2(-/-) і 6 мишей ДТ (+/+), і у мишей MASP-2 (-/-) мало місце статистично значуще зменшення сечовини в крові через 24 і 48 годин (критерій Ст'юдента $p < 0,05$). Ці результати вказують на те, що інгібування активності MASP-2 приблизно може мати захисний або терапевтичний ефект при пошкодженні нирок внаслідок ішемії.

Приклад 13

У даному прикладі описані результати для мишей MASP-2/- в мишачій моделі дегенерації жовтої плями.

Передумови/обґрунтування

Вікова дегенерація жовтої плями (AMD) є основною причиною сліпоти у людей старше за 55 років в промислово розвинених країнах. AMD має дві основні форми: неоваскулярна (волога) AMD і атрофічна (суха) AMD. На неоваскулярну (вологу) форму доводиться 90 % серйозних порушень зору, пов'язаних з AMD, хоча тільки у ~20 % людей з AMD розвивається волога форма. Клінічні ознаки AMD включають множинні друзи, географічну атрофію і хоріоїдальну неоваскуляризацію (CNV). У грудні 2004 р. FDA схвалило макуген (пегаптаніб), представник нового класу офтальмологічних лікарських засобів, які специфічно направлені і блокують ефекти фактора росту ендотелію судин (VEGF), для лікування вологої (неоваскулярної) форми AMD (Ng et al., Nat Rev. Drug Discov 5:123-32 (2006)). Хоча застосування макугена є багатообіцяючим новим методом лікування для підгрупи пацієнтів з AMD, зберігається гостра необхідність в розробці додаткових методів лікування цього складного захворювання. Численні незалежні лінії дослідження вказують на центральну роль активації комплементу в патогенезі AMD. Патогенез хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV), найбільш серйозної форми AMD, може включати шляхи активації комплементу.

Більше двадцяти п'яти років тому Ryan описав індуковану лазером травматичну модель CNV у тварин (Ryan, S.J., Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII:707-745, 1979). Ця модель початково була розроблена з використанням макак-резус, однак відтоді ця ж технологія була використана для розробки аналогічних моделей CNV у різних лабораторних тварин, включаючи мишей (Tobe et al., Am. J. Pathol. 153:1641-46, 1998). У даній моделі лазерну фотокоагуляцію використовують для руйнування мембрани Бруха, що приводить до утворення CNV-подібних мембран. Індукована лазером модель відтворює багато важливих особливостей стану у людини (для нещодавнього огляду, дивись Ambati et al., Survey Ophthalmology 48:257-293, 2003). Індукована лазером модель захворювання на мишах в цей час добре вивчена і використовується як експериментальна основа у великому, і постійно зростаючому, числі дослідницьких проектів. Загальноприйнято, що індукована лазером модель має достатню біологічну схожість з CNV у людини, щоб доклінічні дослідження патогенезу і лікарського інгібування захворювання з використанням даної моделі були корисні для лікування CNV у людини.

Методи

Мишей MASP-2(-/-) отримували, як описано в прикладі 1, і проводили їх зворотне схрещування протягом щонайменше 10 поколінь з C57Bl/6. У даному дослідженні порівнювали результати оцінки самців мишей MASP-2 (-/-) і MASP-2 (+/+) в ході розвитку індукованої лазером CNV, прискореної моделі неоваскулярної AMD, на основі об'єму індукованої лазером CNV, що визначається методом скануючої лазерної конфокальної мікроскопії, як ступінь пошкодження тканин, і з визначенням рівнів VEGF, сильного ангіогенного фактора, залученого в CNV, в пігментному епітелії сітківки (RPE)/судинній оболонці методом ELISA після індукованого лазером ушкодження.

Індукція хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Лазерну фотокоагуляцію (532 нм, 200 мВт, 100 мс, 75 мкм; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) проводив в обох очах кожної тварини в день нуль одна людина, не обізнана про приналежність тварин до конкретних експериментальних груп. Лазерні плями були нанесені стандартним способом навколо зорового нерва, з використанням щільної лампи і покривного скла як контактної лінзи. Морфологічним кінцевим результатом лазерного пошкодження була поява кавітаційного пухирця, ознаки, яка, як вважають, корелює з руйнуванням мембрани Бруха. Більш детально методи і оцінювані критерії ефективності наведені далі.

Флуоресцентна ангіографія

Флуоресцентну ангіографію поводили з використанням камери і системи візуалізації (камера TRC 50 1A; система ImageNet 2.01; Torcon, Paramus, NJ) через 1 тиждень після лазерної фотокоагуляції. Фотографії отримували з використанням 20-D лінзи, що контактує з лінзою фундус-камери, після внутрішньоочеревинної ін'єкції 0,1 мл 2,5 % розчину флуоресцеїну натрію. Фахівець з сітківки, що не бере участі в лазерній фотокоагуляції або ангіографії, оцінював флуоресцентні ангіограми за один сеанс, не маючи інформації про експериментальні групи.

Об'єм хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Через тиждень після індукованого лазером ушкодження ока енуклеювали і фіксували 4 % параформальдегідом протягом 30 хв при 4 °C. Очні чаші отримували шляхом видалення передніх сегментів і тричі промивали в PBS, з подальшою дегідратацією і регідратацією в метанолі з різною концентрацією. Після блокування два рази буфером (PBS, що містить 1 % бичачого сироваткового альбуміну і 0,5 % Triton X-100) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, очні чаші інкубували протягом ночі при 4 °C з 0,5 % розчином FITC-ізолектину B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA) в PBS, що містить 0,2 % BSA і 0,1 % Triton X-100, який зв'язує кінцеві залишки β -D-галактози на поверхні ендотеліальних клітин і вибірково мітить мишачу судинну мережу. Після двох промивань PBS, що містить 0,1 % Triton X-100, нейросенсорну сітківку обережно відшаровували і відділяли від зорового нерва. Робили чотири розслаблювальні радіальні надрізи, комплекс RPE-судинна оболонка-склера, що залишився, розкладали плоско на предметному склі в середовищі, що перешкоджає вигорянню флуоресценції (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector laboratories), і накривали покривним склом.

Плоскі препарати вивчали під скануючим лазерним конфокальним мікроскопом (TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany). Судини візуалізували шляхом збудження синього випромінювання аргону з довжиною хвилі 488 нм і поглинання випромінювання при довжині хвилі від 515 до 545 нм. Використовували 40X масляно-імерсійний об'єктив для всіх досліджень з візуалізацією. Горизонтальні очні зрізи (з кроком 1 мкм) отримували з поверхні комплексу RPE-судинна оболонка-склера. Найглибшу фокальну площину, в якій могла бути ідентифікована навколишня хоріоїдальна судинна мережа, що сполучається з лезією, вважали дном лезії. Будь-яку судину в ділянці лазерного ураження, поверхнева відносно цієї еталонної площини, вважали CNV. Зображення кожного зрізу зберігали в цифровому форматі. Площу пов'язаної з CNV флуоресценції вимірювали шляхом комп'ютерного аналізу зображень з використанням програмного забезпечення мікроскопа (TCS SP; Leica). Суму всієї площі флуоресценції в кожному горизонтальному зрізі використовували як показник об'єму CNV. Візуалізацію виконував оператор, не обізнаний про експериментальні групи.

У зв'язку з імовірністю того, що на кожну індуковану лазером лезію, що приводить до розвитку CNV, впливає група, до якої вона належить (миша, око і лазерна пляма), середні об'єми лезій порівнювали з використанням лінійної змішаної моделі, застосовуючи метод розщепленої ділянки з повторним планом вимірювань. Фактором цілої ділянки була генетична група, до якої належить тварина, в той час як фактором розщепленої ділянки було око. Статистичну значущість визначали на рівні 0,05. Апостеріорні порівняння середніх значень проводили з використанням поправки Бонферроні для множинних порівнянь.

ELISA для VEGF.

Через три дні після ушкоджуючого нанесення 12 лазерних плям комплекс RPE-судинна оболонка обробляли ультразвуком в лізуючому буфері (20 mM імідазол HCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM Na молибдат і 1 mM EDTA з інгібіторами протеаз) на льоду протягом 15 хв. Рівні білка VEGF в супернатанті визначали з використанням набору реактивів для ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), які впізнають всі сплайсовані варіанти, при довжині хвилі 450-570 нм (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) і нормували на загальний рівень білка. Вимірювання в двох повторях проводив не обізнаний про експериментальні групи оператор, що не бере участі в експериментах по фотокоагуляції, візуалізації або ангіографії. Значення для VEGF представляли у вигляді середнього значення $\pm$ SEM з щонайменше трьох незалежних експериментів і порівнювали з використанням U-критерію Уїтні. Нульову гіпотезу відкидали при $P < 0,05$.

Результати

Оцінка рівнів VEGF

На ФІГУРІ 13А наведений графік, що показує рівні білка VEGF в комплексі RPE-судинна оболонка, виділеному у мишей C57Bl6 дикого типу і мишей MASP-2(-/-) в день нуль. Як показано на ФІГУРІ 13А, оцінка рівнів VEGF свідчить про зниження вихідних рівнів VEGF у мишей MASP-2 (-/-) порівняно з контрольними мишами C57Bl6 дикого типу. На ФІГУРІ 13В наведений графік, що показує рівні білка VEGF, виміряні в день три після індукованого лазером ушкодження. Як

показано на ФІГУРІ 13В, рівні VEGF були значно підвищені у мишей дикого типу (+/+) через три дні після індукованого лазером ушкодження, що узгодиться з опублікованими даними (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328-33 (2006)). Однак у мишей MASP-2 (-/-) спостерігали дивно низькі рівні VEGF.

5 Оцінка хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Крім зменшення рівнів VEGF після індукованої дегенерації жовтої плями оцінювали площу CNV до і після індукованого лазером ушкодження. На ФІГУРІ 14 графічно представлений об'єм CNV, виміряний у мишей C57bl дикого типу і мишей MASP-2(-/-) в день сім після індукованого лазером ушкодження. Як показано на ФІГУРІ 14, у мишей MASP-2 (-/-) мало місце зменшення на 10 приблизно 30 % площі CNV в день сім після індукованого лазером ушкодження порівняно з контрольними мишами дикого типу.

Ці результати свідчать про зменшення рівнів VEGF і CNV у мишей MASP (-/-) порівняно з контрольними мишами дикого типу (+/+), і про те, що блокада MASP-2 інгібітором може мати превентивний і терапевтичний ефект при лікуванні дегенерації жовтої плями.

15 Приклад 14

У даному прикладі показано, що активація тромбіну може відбуватися після активації лектинового шляху в фізіологічних умовах, і показаний ступінь участі MASP-2. У нормальній шурячій сироватці активація лектинового шляху приводить до активації тромбіну (що оцінюється на основі відкладення тромбіну) одночасно з активацією комплементу (що оцінюється на основі відкладення C4). Як можна бачити на ФІГУРАХ 15А і 15В, активації 20 тромбіну в даній системі інгібується блокуючим MASP-2 антитілом (формату Fab2), з кривої залежності інгібування від концентрації (ФІГУРА 15В), яка паралельна такій для активації комплементу (ФІГУРА 15А). Ці дані свідчать про те, що активація лектинового шляху, що має місце при травмі, приводить до активації як системи комплементу, так і системи коагуляції, в процесі, який повністю залежить від MASP-2. Отже, блокуючі MASP2 антитіла можуть виявитися 25 ефективними для зменшення надмірної системної коагуляції, наприклад, дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції, яка є одним з факторів, що приводять до смерті у випадках серйозної травми.

Приклад 15

У даному прикладі наведені результати, отримані з використанням локалізованої реакції Шварцмана, що є моделлю дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції ("DIC"), у мишей з дефіцитом MASP-2 (-/-) і мишей з нормальним рівнем MASP-2 (+/+) для оцінки ролі лектинового шляху при DIC.

Передумови/обґрунтування

Як описано вище, блокування MASP-2 інгібує активацію лектинового шляху і приводить до зменшення утворення обох анафілатоксинів, C3а і C5а. Анафілатоксини C3а, як показано, є сильними чинниками, що викликають агрегацію тромбоцитів, *in vitro*, але їх роль *in vivo* менш вивчена, і вивільнення речовин тромбоцитів і плазміну при загоєнні ран може лише повторно залучати C3 комплементу. У даному прикладі роль лектинового шляху аналізували у мишей 40 MASP-2 (-/-) і мишей ДТ (+/+) для визначення того, чи необхідне тривале підвищення активації C3 для розвитку дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції.

Методи

Мишей MASP-2(-/-) отримували, як описано в прикладі 1, і проводили їх зворотне схрещування протягом щонайменше 10 поколінь з C57Bl/6.

У даному експерименті використовували модель локалізованої реакції Шварцмана. Локалізована реакція Шварцмана (LSR) являє собою індуковану ліпополісахаридом (LPS) відповідь з добре охарактеризованим внеском клітинних і гуморальних елементів вродженої імунної системи. Залежність LSR від комплементу добре відома (Polak, L., et al., Nature 223:738-739 (1969); Fong J.S. et al., J Exp Med 134:642-655 (1971)). В моделі LSR мишей примували 50 протягом 4 годин TNF-альфа (500 нг, внутрішньомошочно), мишей піддавали анестезії і готували для прижиттєвої мікроскопії м'яза, який підтримує яєчко. Для спостереження були вибрані мережі посткапілярних венул (діаметром 15-60 мкм) з хорошим кровотоком (1-4 мм/с). Тваринам вводили флуоресцентні антитіла для вибіркового мічення нейтрофілів або тромбоцитів. Мережу судин послідовно сканували, і зображення всіх судин записували в 55 цифровому форматі для подальшого аналізу. Після запису вихідного стану мікроциркуляції миші отримували одну внутрішньовенну ін'єкцію LPS (100 мкг), або окремо, або в поєднанні з засобами, перерахованими нижче. Потім ту ж мережу судин сканували кожні 10 хвилин протягом 1 години. Специфічне накопичення флуорофорів визначали шляхом віднімання фонового рівня флуоресценції, і зображення поліпшували за рахунок встановлення порогу 60 зображення. Величину реакцій визначали на основі записаних зображень. Основною мірою

реакцій Шварцмана були сукупні дані.

У дослідженні порівнювали мишей з нормальним рівнем MASP-2 (+/+), або дикого типу, а також мишей, підданого впливу або відомого деплеторного засобу для шляху комплементу, фактора отрути кобри (CVF), або інгібітора термінального компонента комплементу (антагоніста C5aR). Результати (ФІГУРА 16A) показують, що як CVF, так і антагоніст C5aR, запобігають появі агрегатів в судинній мережі. Крім того, у мишей з дефіцитом MASP-2 (-/-) (ФІГУРА 16B) також спостерігали повне інгібування локалізованої реакції Шварцмана, що вказувало на залученість лектинового шляху. Ці результати чітко показують роль MASP-2 в розвитку DIC і свідчать на користь використання інгібіторів MASP-2 для лікування і запобігання DIC.

Приклад 16

У даному прикладі описаний аналіз мишей MASP-2 (-/-) в мишачій моделі трансплантації нирки.

Передумови/обґрунтування

Роль MASP-2 в функціональних наслідках трансплантації нирки оцінювали з використанням мишачої моделі.

Методи

Функціональні наслідки трансплантації нирки оцінювали з використанням одного ізотрансплантата нирки односторонньо нефректомізованим мишам-реципієнтам, шести одержуючим трансплантат мишам ДТ (+/+) (B6) і шести одержуючим трансплантат мишам MASP-2 (-/-). Для оцінки функції трансплантованої нирки природну нирку, що залишилася, видаляли реципієнтам через 5 днів після трансплантації, і ниркову функцію оцінювали через 24 години шляхом вимірювання рівнів азоту сечовини крові (BUN).

Результати

На ФІГУРІ 17 наведений графік, що показує рівні азоту сечовини крові (BUN) через 6 днів після трансплантації нирки у реципієнтів ДТ (+/+) і реципієнтів MASP-2 (-/-). Як показано на ФІГУРІ 17, сильно підвищені рівні BUN спостерігали у реципієнтів трансплантата мишей ДТ (+/+) (B6) (нормальні рівні BUN у мишей становлять <5 мМ), що вказувало на ниркову недостатність. Навпаки, у реципієнтів ізотрансплантата мишей MASP-2 (-/-) спостерігали значно більш низькі рівні BUN, що свідчило про поліпшену ниркову функцію. Потрібно зазначити, що дані результати були отримані з використанням трансплантатів від донорів нирок ДТ (+/+), це вказувало на те, що відсутність функціонального лектинового шляху тільки у реципієнта трансплантата є достатньою для досягнення сприятливого терапевтичного результату.

У сукупності дані результати показують, що інгібування лектинового шляху за рахунок інгібування MASP-2 являє собою спосіб зменшення захворюваності і продовження функціонування трансплантата при трансплантації нирки, і що даний підхід, судячи з усього, буде корисним в інших варіантах трансплантації.

Приклад 17

У даному прикладі показано, що миші MASP-2 (-/-) є стійкими до септичного шоку в мишачій моделі полімікробного септичного перитоніту.

Передумови/обґрунтування

Для оцінки потенційних ефектів MASP-2 (-/-) при інфекції використовували перев'язку і прокол сліпої кишки (CLP), модель полімікробного септичного перитоніту. Цю модель вважають найбільш точним відображенням процесів, що відбуваються при септичному перитоніті людини. Перев'язка і прокол сліпої кишки (CLP) являє собою модель, в якій сліпу кишку перев'язують і проколюють голкою, що приводить до постійного витоку в черевну порожнину бактерій, які потрапляють в кров через лімфодренаж і потім розподіляються по всіх органах черевної порожнини, що приводить до поліорганної недостатності і септичного шоку (Eskandari et al., J Immunol 148(9):2724-2730 (1992)). Модель CLP імітує протікання сепсису у пацієнтів і індукуює ранню гіперзапальну відповідь, з подальшою вираженою гіпозапальною фазою. Під час цієї фази тварини є у високій мірі чутливими до бактеріального зараження (Wichterman et al., J. Surg. Res. 29(2):189-201 (1980)).

Методи

Смертність в результаті полімікробної інфекції з використанням моделі перев'язки і проколу сліпої кишки (CLP) вивчали на мишах ДТ (+/+) (n=18) і мишах MASP-2 (-/-) (n=16). Коротко, мишей з дефіцитом MASP-2 і їх однополових дикий тип анестезували, сліпу кишку виводили на поверхню тіла і перев'язували в ділянці на 30 % вище за дистальний кінець. Після цього сліпу кишку проколювали один раз голкою діаметром 0,4 мм. Потім сліпу кишку повертали в черевну порожнину і розріз в шкірі закривали затискачами. Виживаність мишей, підданих CLP, контролювали протягом 14 днів після CLP. Перитонеальний лаваж збирали у мишей через 16 годин після CLP для вимірювання бактеріального навантаження. Готували серійне розведення

перитонеального лаважу в PBS і інокулювали в чашки зі середовищем Мюллера-Хінтона, з подальшою інкубацією при 37 °C в анаеробних умовах протягом 24 годин, після чого визначали бактеріальне навантаження. Також вимірювали відповідь на бактеріальну інфекцію у вигляді продукування TNF-альфа у мишей ДТ (+/+) і MASP-2 (-/-) через 16 годин після CLP в легенях і селезінці методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (кРЧ-ПЛР). Сироватковий рівень TNF-альфа через 16 годин після CLP у мишей ДТ (+/+) і MASP-2 (-/-) також кількісно визначали методом ELISA в форматі сендвіч.

Результати

На ФІГУРІ 18 графічно представлена виживаність, у відсотках, підданих CLP тварин залежно від кількості днів після процедури CLP. Як показано на ФІГУРІ 18, відсутність лектинового шляху у мишей MASP-2 (-/-) не приводить до збільшення смертності мишей після полімікробної інфекції в моделі перев'язки і проколу сліпої кишки, порівняно з мишами ДТ (+/+). Однак, як показано на ФІГУРІ 19, у мишей MASP-2 (-/-) спостерігали набагато більш високе бактеріальне навантаження (збільшення приблизно в 1000 раз по кількості бактерій) в перитонеальному лаважу після CLP порівняно з їх однопоносниками ДТ (+/+). Ці результати показують, що миші з дефіцитом MASP-2 (-/-) є стійкими до септичного шоку. Менший кліренс бактерій у мишей з дефіцитом MASP-2 в даній моделі може бути наслідком порушеного C3b-опосередкованого фагоцитозу, оскільки було показано, що відкладення C3 залежить від MASP-2.

Було встановлено, що відповідь на бактеріальну інфекцію у вигляді продукування цитокіну TNF-альфа не був підвищений у мишей MASP-2 (-/-) порівняно з контролями ДТ (+/+) (дані не представлені). Також було показано, що мала місце значно більш висока сироваткова концентрація TNF-альфа у мишей ДТ (+/+) через 16 годин після CLP, на відміну від мишей MASP-2 (-/-), у яких сироватковий рівень TNF-альфа залишався практично незмінним. Ці результати свідчать про те, що інтенсивна запальна відповідь на септичний стан була пом'якшена у мишей MASP-2 (-/-), що дозволяло тваринам виживати при наявності великої кількості бактерій.

У сукупності дані результати демонструють потенційні шкідливі ефекти лектинового шляху активації комплементу у випадку септицемії і підвищеної смертності у пацієнтів з генералізованим сепсисом. Ці результати також показують, що дефіцит MASP-2 приводить до модуляції запальної імунної відповіді і зменшення рівнів експресії запальних медіаторів при сепсисі. Таким чином, можна передбачити, що інгібування MASP-2 (-/-) шляхом введення інгібуючих моноклональних антитіл проти MASP-2 було б ефективним для зменшення запальної відповіді у суб'єкта, який страждає на септичного шоку.

Приклад 18

У даному прикладі описаний аналіз мишей MASP-2 (-/-) в мишачій моделі інтраназальної інфекційності.

Передумови/обґрунтування

Pseudomonas aeruginosa являє собою грамнегативний опортуністичний бактеріальний патоген людини, який викликає різні інфекції, особливо у людей з ослабленим імунітетом. Ця бактерія є основним джерелом набутих внутрішньолікарняних інфекцій, зокрема, лікарняної пневмонії. Вона також є причиною значної захворюваності і смертності у пацієнтів з кістозним фіброзом (CF). Легенева інфекція, що викликається *P. aeruginosa*, характеризується сильним рекрутингом нейтрофілів і значним легневим запаленням, що приводить до сильного ушкодження тканин (Palanki M.S. et al., J. Med. Chem 51:1546-1559 (2008)).

У даному прикладі описане дослідження, зроблене для визначення того, чи підвищує усунення лектинового шляху у мишей MASP-2 (-/-) сприйнятливість мишей до бактеріальної інфекції.

Методи

Двадцять дві миші ДТ (+/+), двадцять дві миші MASP-2 (-/-) і одинадцять мишей C3 (-/-) заражали шляхом інтраназального введення штаму бактерії *P. aeruginosa*. Мишей спостерігали протягом шести днів після інфекції і будували графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність у відсотках.

Результати

На ФІГУРІ 20 представлений графік Каплана-Мейєра виживаності, у відсотках, мишей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-) або C3 (-/-) через шість днів після інфікування. Як показано на ФІГУРІ 20, був відсутній різниця між мишами MASP-2 (-/-) і мишами ДТ (+/+). Однак результатом усунення класичного (C1q) шляху комплементу у мишей C3 (-/-) була сильна сприйнятливість до бактеріальної інфекції. Ці результати показують, що інгібування MASP-2 не підвищує сприйнятливість до бактеріальної інфекції, свідчаючи про те, що можливо зменшувати небажані

запальні ускладнення у травмованих пацієнтів шляхом інгібування MASP-2 без зменшення здатності пацієнтів боротися з інфекціями за рахунок класичного шляху комплементу.

Приклад 19

У даному прикладі описаний фармакодинамічний аналіз репрезентативних високоафінних анти-MASP-2 Fab2 антитіл, ідентифікованих, як описано в прикладі 10.

Передумови/обґрунтування

Як описано в прикладі 10, для ідентифікації високоафінних антитіл, що блокують лектиновий шлях у щурів, використовували щурячий білок MASP-2 для сортування бібліотеки фагового дисплея. Ця бібліотека була спроектована для забезпечення високого ступеня імунологічної різноманітності, і була створена з використанням повністю людських послідовностей генів імуноглобулінів. Як описано в прикладі 10, було ідентифіковано приблизно 250 окремих фагових клонів, які зв'язували з високою афінністю щурячий білок MASP-2 при проведенні скринінгу методом ELISA. Секвенування цих клонів дозволило ідентифікувати 50 унікальних фагів, що кодуєть анти-MASP-2 антитіло. Білок Fab2 був експресований з цих клонів, очищений і проаналізований на афінність зв'язування MASP-2 і функціональне інгібування лектинового шляху комплементу.

Як показано в ТАБЛИЦІ 6 прикладу 10, внаслідок цього аналізу були ідентифіковані 17 анти-MASP-2 Fab2 з блокуючою функцією активністю (коефіцієнт позитивних успішних знахідок блокуючих антитіл 34 %). Функціональне інгібування лектинового шляху комплементу Fab2 було очевидно на основі відкладення C4, яка є прямим показником розщеплення C4 за рахунок MASP-2. Важливо зазначити, що інгібування було в рівній мірі очевидним при оцінці активності C3-конвертази, вказуючи на функціональне блокування лектинового шляху комплементу. 17 блокуючих MASP-2 Fab2, ідентифікованих, як описано в прикладі 10, сильно інгібують утворення C3-конвертази з величинами IC₅₀, рівними, або менше, 10 нМ. Вісім з 17 ідентифікованих Fab2 мають величину IC₅₀ в субнанолярному діапазоні. Крім того, все 17 блокуючих MASP-2 Fab2 викликають практично повне інгібування утворення C3-конвертази в аналізі утворення C3-конвертази лектинового шляху, як показано на ФІГУРАХ 8А-С, і підсумовано в ТАБЛИЦІ 6 прикладу 10. Більше того, кожне з 17 блокуючих анти-MASP-2 Fab2, наведених в ТАБЛИЦІ 6, сильно інгібує утворення C3b (>95 %), таким чином, демонструючи специфічність даного аналізу для C3-конвертази лектинового шляху.

Ізотипічні варіанти повнорозмірних антитіл щура IgG2c і миші IgG2a були отримані з Fab2 № 11. У даному прикладі описана *in vivo* характеристика даних ізотипів відносно фармакодинамічних параметрів.

Методи

Як описано в прикладі 10, щурячий білок MASP-2 був використаний для сортування фагово-дисплейної бібліотеки Fab, з якого ідентифікували Fab2 № 11. Ізотипічні варіанти повнорозмірних антитіл щура IgG2c і миші IgG2a були отримані з Fab2 № 11. Як щурячий IgG2c, так і мишачий IgG2a, ізотипи повнорозмірних антитіл були охарактеризовані *in vivo* відносно фармакодинамічних параметрів таким чином.

In vivo дослідження на мишах

Проводили фармакодинамічне дослідження на мишах для вивчення ефекту введення анти-MASP-2 антитіла на активність лектинового шляху в плазмі *in vivo*. У даному дослідженні визначали відкладення C4 *ex vivo* в аналізі для лектинового шляху в різні моменти часу після підшкірного (п/ш) і внутрішньочеревинного (в/ч) введення 0,3 мг/кг або 1,0 мг/кг мишачого анти-MASP-2 моАт (мишаче повнорозмірне антитіло ізотипу IgG2a, отримане з Fab2 № 11).

На ФІГУРІ 21 графічно представлено характерне для лектинового шляху відкладення C4b, виміряне *ex vivo* в нерозбавлених зразках сироватки, отриманих від мишей (n=3 мишей/групи) в різні моменти часу після підшкірного введення дози або 0,3 мг/кг, або 1,0 мг/кг, мишачого анти-MASP-2 моАт. Зразки сироватки від мишей, зібрані до введення антитіла, служили як негативні контролю (100 % активність), при цьому сироватка, в яку додавали *in vitro* те ж блокуюче анти-MASP-2 антитіло в концентрації 100 нМ, була використана як позитивний контроль (0 % активності).

Результати, представлені на ФІГУРІ 21, показують швидке і повне інгібування відкладення C4b після підшкірного введення дози 1,0 мг/кг мишачого анти-MASP-2 моАт. Часткове інгібування відкладення C4b спостерігали після підшкірного введення дози 0,3 мг/кг мишачого анти-MASP-2 моАт.

Динаміку відновлення лектинового шляху контролювали протягом трьох тижнів після однократного в/ч введення мишам мишачого анти-MASP-2 моАт в дозі 0,6 мг/кг. Як показано на ФІГУРІ 22, різке падіння активності лектинового шляху відбувалося після введення антитіла, з подальшим повним інгібуванням лектинового шляху, яке продовжувалося протягом приблизно 7

днів після в/ч введення. Повільне відновлення активності шляху спостерігали протягом другого і третього тижнів, з повним відновленням лектинового шляху у мишей через 17 днів після введення анти-MASP-2 моАт.

Ці результати показують, що мишаче анти-MASP-2 моАт, отримане з Fab2 № 11, при системній доставці інгібує лектиновий шлях у мишей залежним від дози чином.

Приклад 20

У даному прикладі описаний аналіз ефективності мишачого анти-MASP-2 моАт, отриманого з Fab2 № 11, в мишачій моделі вікової дегенерації жовтої плями.

Передумови/обґрунтування

Як описано в прикладі 10, щурячий білок MASP-2 був використаний для сортування фагово-дисплейної бібліотеки Fab, з якого ідентифікували Fab2 № 11 як функціонально активне антитіло. З Fab2 № 11 були отримані повнорозмірні антитіла щура ізотипу IgG2c і миші ізотипу IgG2a. Повнорозмірне мишаче анти-MASP-2 антитіло ізотипу IgG2a було охарактеризоване відносно фармакодинамічних параметрів, як описано в прикладі 19. У даному прикладі повнорозмірне мишаче анти-MASP-2 антитіло, отримане з Fab2 № 11, аналізували в мишачій моделі вікової дегенерації жовтої плями (AMD), описаній в Bora P.S. et al., J Immunol 174:491-497 (2005).

Методи

Мишаче повнорозмірне анти-MASP-2 антитіло ізотипу IgG2a, отримане з Fab2 № 11, як описано в прикладі 19, тестували в мишачій моделі вікової дегенерації жовтої плями (AMD), як описано в прикладі 13, з наступними модифікаціями.

Введення мишачих анти-MASP-2 моАт

Дві різні дози (0,3 мг/кг і 1,0 мг/кг) мишачого анти-MASP-2 моАт, нарівні з контрольним по ізотипу моАт, вводили в/ч ін'єкцією мишам ДТ (+/+) (n=8 мишей на групу) за 16 годин до індукції CNV.

Індукція хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Індукцію хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV) і вимірювання об'єму CNV проводили методом лазерної фотокоагуляції, як описано в прикладі 13.

Результати

На ФІГУРІ 23 графічно представлена площа CNV, виміряна через 7 днів після індукованого лазером ушкодження у мишей, що отримували або контрольні по ізотипу моАт, або мишачі анти-MASP-2 моАт (0,3 мг/кг і 1,0 мг/кг). Як показано на ФІГУРІ 23, у мишей, що заздалегідь отримували дозу 1,0 мг/кг анти-MASP-2 моАт, спостерігали статистично значуще (p < 0,01) приблизно 50 % зменшення CNV через сім днів після впливу лазером. Як також показано на ФІГУРІ 23, встановлено, що доза 0,3 мг/кг анти-MASP-2 моАт була неефективна для зменшення CNV. Потрібно зазначити, що доза 0,3 мг/кг анти-MASP-2 моАт, як показано, приводить до часткового і тимчасового інгібування відкладення C4b після підшкірного введення, як описана в прикладі 19 і показана на ФІГУРІ 21.

Результати, описані в даному прикладі, демонструють, що блокування MASP-2 інгібітором, таким як анти-MASP-2 моАт, надає превентивний і/або терапевтичний ефект при лікуванні дегенерації жовтої плями. Також потрібно зазначити, що ці результати узгодяться з результатами, отриманими в проведеному на мишах MASP-2 (-/-) дослідженні, описаному в прикладі 13, в якому спостерігали 30 % зменшення CNV через 7 днів після впливу лазером у мишей MASP-2 (-/-), порівняно з контрольними мишами дикого типу. Крім того, результати в даному прикладі також показують, що анти-MASP-2 антитіло, що системно доставляється, надає локальний терапевтичний ефект в оку, це підкреслює можливість використання системного шляху введення для лікування пацієнтів з AMD. Підводячи підсумок, дані результати надають докази на користь використання анти-MASP-2 моАт в лікуванні AMD.

Приклад 21

У даному прикладі показано, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від *Neisseria meningitidis* загибелі, що викликається після інфікування *N. meningitidis* і мають підвищений кліренс бактерій порівняно з контрольними мишами дикого типу.

Обґрунтування

Neisseria meningitidis є гетеротрофною грамнегативною диплококовою бактерією, відомою своєю роллю в розвитку менінгіту і інших форм менінгококових захворювань, наприклад, менінгококемії. *N. meningitidis* є основною причиною захворюваності і смертності в дитячому віці. Важкі ускладнення включають септицемію, синдром Уотерхауса-Фрідріхсена, недостатність надниркових залоз і дисеміновану внутрішньосудинну коагуляцію (DIC). Дивись, наприклад, Rintala E. et al., Critical Care Medicine 28(7):2373-2378 (2000). В даному прикладі роль лектинового шляху аналізували у мишей MASP-2 (-/-) і ДТ (+/+) для з'ясування того, чи будуть

миші з дефіцитом MASP-2 схильні до загибелі, що викликається *N. meningitidis*.

Методи

Мишей з нокаутом MASP-2 отримували, як описано в прикладі 1, і проводили їх зворотне схрещування протягом щонайменше 10 поколінь з C57Bl/6. Мишам MASP-2 KO (n=10) і мишам C57/Bl6 дикого типу (n=10) у віці 10 тижнів вводили внутрішньовенною ін'єкцією дозу 5×10^8 КУО/100 мкл, 2×10^8 КУО/100 мкл або 3×10^7 КУО/100 мкл *Neisseria meningitidis* серогрупи A Z2491 в 400 мг/кг комплексі залізо-декстран. Вживаність мишей після інфікування контролювали протягом 72-годинного періоду часу. Зразки крові отримували від мишей з годинними інтервалами після інфікування і аналізували для визначення сироваткового рівня (log КУО/мл) *N. meningitidis* з метою підтвердження інфекції і визначення ступеня кліренсу бактерій з сироватки.

Результати

На ФІГУРІ 24А графічно представлена виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після введення інфекційної дози 5×10^8 /100 мкл КУО *N. meningitidis*. Як показано на ФІГУРІ 24А, після інфікування найвищою дозою 5×10^8 /100 мкл КУО *N. meningitidis* 100 % мишей MASP-2 KO виживали протягом усього 72-годинного періоду спостереження після інфікування. Навпаки, лише 20 % мишей ДТ були всі ще живі через 24 години після інфікування. Ці результати показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis*.

На ФІГУРІ 24В наведений графік, що показує log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 KO і ДТ, інфікованих 5×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*. Як показано на ФІГУРІ 24В, у мишей ДТ рівень *N. meningitidis* в крові досягав пікового значення приблизно 6,5 log КУО/мл через 24 години після інфікування і падав до нуля через 48 годин після інфікування. Навпаки, у мишей MASP-2 KO рівень *N. meningitidis* досягав пікового значення приблизно 3,5 log КУО/мл через 6 годин після інфікування і падав до нуля через 36 годин після інфікування.

На ФІГУРІ 25А наведений графік, що показує виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після інфікування 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*. Як показано на ФІГУРІ 25А, після інфікування дозою 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis* 100 % мишей MASP-2 KO виживали протягом усього 72-годинного періоду спостереження після інфікування. Навпаки, лише 80 % мишей ДТ були всі ще живі через 24 години після інфікування. Схоже з результатами, показаними на ФІГУРІ 24А, ці результати також показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis*.

На ФІГУРІ 25В наведений графік, що показує log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей ДТ, інфікованих 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*. Як показано на ФІГУРІ 25В, рівень *N. meningitidis* в крові у мишей ДТ, інфікованих 2×10^8 КУО, досягав пікового значення приблизно 4 log КУО/мл через 12 годин після інфікування і падав до нуля через 24 години після інфікування. На ФІГУРІ 25С наведений графік, що показує log КУО/мл *N. meningitidis*, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 KO, інфікованих 2×10^8 КУО/100 мкл *N. meningitidis*. Як показано на ФІГУРІ 25С, рівень *N. meningitidis* в крові мишей MASP-2 KO, інфікованих 2×10^8 КУО, досягав пікового значення приблизно 3,5 log КУО/мл через 2 години після інфікування і падав до нуля через 3 години після інфікування. Схоже з результатами, показаними на ФІГУРІ 24В, ці результати демонструють, що хоч миші MASP-2 KO були інфіковані такою ж дозою *N. meningitidis*, що і миші ДТ, у мишей MASP-2 KO мав місце підвищений кліренс бактерій з крові порівняно з мишами ДТ.

Вживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після інфікування самої низькою дозою 3×10^7 КУО/100 мкл *N. meningitidis*, становила 100 % через 72 години (дані не представлені).

Обговорення

Отримані результати показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis* і мають підвищений кліренс бактерій з крові порівняно з мишами ДТ. Таким чином, враховуючи ці результати, очікується, що терапевтичне застосування інгібіторів MASP-2, таких як анти-MASP-2 моАт, буде ефективним для лікування, запобігання або ослабленню ефектів інфекції, що викликається бактеріями *N. meningitidis* (тобто, сепсису і DIC). Крім того, ці результати показують, що терапевтичне застосування інгібіторів MASP-2, таких як анти-MASP-2 моАт, не буде привертати суб'єкта до підвищеного ризику зараження *N. meningitidis*.

Приклад 22

У даному прикладі описане відкриття нової опосередкованої лектиновим шляхом і залежної від MASP-2 активації С3 комплементу в обхід С4.

Обґрунтування

Основна терапевтична користь від використання інгібіторів активації комплементу для

обмеження ішемії/реперфузійного пошкодження міокарда (MIRI) була переконливо продемонстрована в експериментальній щурячій моделі інфаркту міокарда два десятиріччя назад: рекомбінантний sCR1, розчинне укорочене похідне клітинного поверхневого рецептора комплементу 1 типу (CR1), вводили внутрішньовенно, і його ефект оцінювали в щурячій *in vivo* моделі MIRI. Введення sCR1 приводило до зменшення об'єму інфаркту на більше ніж 40 % (Weisman, H.F., et al., *Science* 249:146-151 (1990)). Терапевтичний потенціал цього рекомбінантного інгібітора згодом був продемонстрований в клінічному випробуванні, в якому було показано, що введення sCR1 пацієнтам з MI запобігало скорочувальній недостатності в постішемічному серці (Shandelya, S., et al., *Circulation* 87:536-546 (1993)). Однак основний механізм, що приводить до активації комплементу в ішемічній тканині, не був остаточно з'ясований, в основному через відсутність відповідних експериментальних моделей, обмежене розуміння молекулярних процесів, що приводить до активації комплементу в позбавлених кисня клітинах, а також взаємозв'язку і синергізму між різними шляхами активації комплементу.

Як фундаментальний компонент імунної відповіді система комплементу забезпечує захист від проникаючих мікроорганізмів за рахунок як залежних, так і не залежних, від антитіл механізмів. Вона організує множинну клітинних і гуморальних взаємодій в процесі імунної відповіді, включаючи хемотаксис, фагоцитоз, адгезію клітин і В-клітинну диференціацію. Три різних шляхи ініціюють каскад комплементу: класичний шлях, альтернативний шлях і лектиновий шлях. У класичній шляху підкомпонент впізнавання C1q зв'язується з різними мішенями - переважно імунними комплексами - ініціюючи поетапну активацію пов'язаних серинових протеаз, C1r і C1s, які забезпечують основний механізм кліренсу патогену і імунного комплексу після залучення адаптивної імунної системи. Зв'язування C1q з імунними комплексами приводить до перетворення димера зимогену C1r в його активну форму для розщеплення і, тим самим, активації C1s. C1s переводить зв'язування C1q в активацію комплементу в двох етапах розщеплення: спочатку він перетворює C4 в C4a і C4b, а потім розщеплює зв'язаний з C4b C2, з утворенням C3-конвертази C4b2a. Цей комплекс перетворює компонент C3, в достатку присутній в плазмі, в C3a і C3b. Накопичення C3b в безпосередній близькості від комплексу C4b2a приводить до зміщення субстратної специфічності з C3 на C5, з утворенням C5-конвертази C4b2a(C3b)_n. Комплекси C3 і C5-конвертази, отримані через класичний шлях активації, ідентичні тим, які отримані в лектиновому шляху активації. У альтернативній шляху спонтанний низькорівневий гідроліз компонента C3 приводить до відкладення білкових фрагментів на клітинних поверхнях, запускаючи активацію комплементу на чужорідних клітинах, в той час як пов'язані з клітинами регуляторні білки на тканинах хазяїна запобігають активації, таким чином запобігаючи саморуйнування. Подібно до альтернативного шляху, лектиновий шлях може активуватися при відсутності імунних комплексів. Активація ініціюється зв'язуванням мультимолекулярного комплексу активації лектинового шляху з патоген-асоційованим молекулярним патерном (Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP)), переважно вуглеводними структурами, присутніми на бактеріальних, грибових або вірусних патогенах, або з абераантними патернами глікозилювання на апоптотичних, некротичних, злоякісних або позбавлених кисню клітинах (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., *N. Engl. J. Med.* 344:1058-1066 (2001); Schwaebler, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466 (2002); і Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353 (2002)).

Манан-зв'язувальний лектин (MBL) був що першим впізнає вуглевод підкомпонентом, який, як показано, утворює комплекси з групою нових серинових протеаз, які називаються MBL-асоційованими сериновими протеазами (MASP) і пронумерованих в порядку їх відкриття (тобто, MASP-1, MASP-2 і MASP-3). У людини комплекси активації лектинового шляху можуть бути утворені з чотирма альтернативними підкомпонентами, які впізнають вуглевод, з різною специфічністю відносно зв'язуваних вуглеводів, тобто, 2 MBL, і трьома різними представниками сімейства фіколінів, а саме, L-фіколіном, H-фіколіном і M-фіколіном, а також MASP. Дві форми MBL, MBL A і MBL C, і фіколін-A утворюють комплекси активації лектинового шляху з MASP в плазмі мишей і щурів. Автори винаходу раніше клонували і охарактеризували MASP-2 і додатковий укорочений продукт гена MASP-2 розміром 19 кДа, названий MAP19 або sMAP, у людини, миші і щурів (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510 (1997); Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 162:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863 (1999); і Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 163:6848-6859 (1999)). MAP19/sMAP позбавлений протеазної активності, однак може регулювати активацію лектинового шляху, конкуруючи з MASP за зв'язування з комплексами, які впізнають вуглеводи (Iwaki, D. et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632 (2006)).

Існують докази того, що з трьох MASP лише MASP-2 необхідний для переведення зв'язування впізнавальних комплексів лектинового шляху в активацію комплементу (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., *J. Immunol.*

165:878-887 (2000); Rossi, V., et al., J. Biol. Chem. 276:40880-40887 (2001)). Цей висновок підтверджується фенотипом нещодавно описаної лінії мишей з дефіцитом MASP-1 і MASP-3. За винятком затримки початку опосередкованого лектиновим шляхом активації комплементу *in vitro* миші з дефіцитом MASP-1/3 зберігають функціональну активність лектинового шляху. Додавання в сироватку, дефіцитну по MASP-1 і MASP-3, рекомбінантного MASP-1 дозволяє подолати цю затримку в активації лектинового шляху, з чого можна передбачити, що MASP-1 може полегшувати активацію MASP-2 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)). В нещодавньому дослідженні було продемонстровано, що MASP-1 (і можливе також MASP-3) необхідний для перетворення ферменту активації альтернативного шляху фактора D з його форми зимогену в ферментативно активну форму (Takahashi M. et al., J Exp Med 207(1):29-37 (2010)). Фізіологічна важливість цього процесу підкреслюється відсутністю функціональної активності альтернативного шляху в плазмі у мишей з дефіцитом MASP-1/3.

У нещодавно отриманих ліній мишей з комбінованим направленим дефіцитом підкомпонентів лектинового шляху MBL A і MBL C, що впізнають вуглевод, все ще може ініціюватися активація лектинового шляху через впізнавальний підкомпонент лектинового шляху, що залишився, у мишей, фіколін A (Takahashi, K., et al., Microbes Infect. 4:773-784 (2002)). Відсутність якої-небудь залишкової функціональної активності лектинового шляху у мишей з дефіцитом MASP-2 дозволяє мати переконливу модель для вивчення ролі цієї ефекторної гілки вродженого гуморального імунітету в здоровому стані і в хворобі.

Наявність ліній мишей з дефіцитом C4 і MASP-2 дозволила авторам винаходу визначити новий специфічний для лектинового шляху, але залежний від MASP-2, шлях активації компонента комплементу C3 в обхід C4. Важливий внесок цього нового опосередкованого лектиновим шляхом шляху активації в обхід C4 в пост-ішемічну втрату тканини підкреслюється видатним захисним фенотипом з дефіцитом MASP-2 при MIRI, в той час як у мишей з дефіцитом C4, протестованих в тій же моделі, захист був відсутній.

У даному прикладі автори винаходу описують новий опосередкований лектиновим шляхом і залежний від MASP-2 шлях активації компонента C3 комплементу в обхід C4. На фізіологічну важливість цього нового шляху активації вказує захисний фенотип з дефіцитом MASP-2 в експериментальній моделі ішемії/реперфузійного пошкодження міокарда (MIRI), в якій тварини з дефіцитом C4 не були захищені.

Методи

У мишей з дефіцитом MASP-2 відсутні виражені аномалії

Мишей з дефіцитом MASP-2 отримували, як описано в прикладі 1. Як гетерозиготні (+/-), так і гомозиготні (-/-), миші з дефіцитом MASP-2 є здоровими і фертильними, і у них відсутні виражені аномалії. Очікувана тривалість життя у них така ж, як у їх однопоносників ДТ (>18 місяців). Перед вивченням фенотипу цих мишей в експериментальних моделях захворювання мишей отриманої авторами винаходу лінії MASP-2/- зворотно схрещували протягом одинадцяти поколінь на генетичному фоні C57BL/6. Повна відсутність мРНК MASP-2 була підтверджена нозерн-блоттингом відібраних з полі А+ препаратів РНК з печінки, при цьому 1,2-т.п.н. мРНК, що кодує MAP19 або sMAP (укорочений продукт альтернативного сплайсингу гена MASP2), експресується у великих кількостях.

Результати кРЧ-ПЛР аналізу з використанням пар праймерів, специфічних або для кодуєчої послідовності домену серинової протеази MASP-2 (В-ланцюга), або кодуєчої послідовності для А-ланцюга, що залишилася, показали, що відсутня мРНК, яка піддається виявленню, що кодує В-ланцюг, у мишей MASP-2/-, в той же час відносний вміст транскрипта мРНК порушеного А-ланцюга був значно підвищений. Аналогічно, відносний вміст мРНК, що кодує MAP19/sMAP, підвищений у мишей MASP-2+/- і MASP-2/-/. Рівні в плазмі MASP-2, що визначаються методом ELISA для 5 тварин кожного генотипу, становили 300 нг/мл для контролів ДТ (діапазон 260-330 нг/мл), 360 нг/мл для гетерозиготних мишей (діапазон 330-395 нг/мл) і не піддавалися визначенню у мишей MASP-2/-/. З використанням кРЧ-ПЛР були отримані профілі експресії мРНК, які показують, що у мишей MASP-2/- експресується мРНК для MBL A, MBL C, фіколіну А, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, фактора В, фактора D, C4 і C3 у відносних кількостях, аналогічних тим, які є у їх однопоносників з достатнім вмістом MASP-2 (дані не представлені).

Рівні в плазмі C3 у однопоносних мишей MASP-2/- (n=8) і MASP-2+/+ (n=7) вимірювали з використанням комерційно доступного набору для аналізу ELISA мишачого C3 (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA). Рівні C3 у мишей з дефіцитом MASP-2 (середнє 0,84 мг/мл, $\pm$ 0,34) були аналогічні таким у контролів ДТ (середнє 0,92, $\pm$ 0,37).

Результати

MASP-2 необхідний для функціональної активності лектинового шляху.

Як описано в прикладі 2 і показано на ФІГУРІ 5, результати *in vitro* аналізу плазми MASP-2/-

показали повну відсутність функціональної активності лектинового шляху на активуючих покритих мананом і зимозаном поверхнях для активації C4. Аналогічно, не було виявлене залежне від лектинового шляху розщеплення C4 або C3 в плазмі MASP-2/- на поверхнях, покритих N-ацетилглюкозаміном, який зв'язує і запускає активацію через MBL A, MBL C і фіколін A (дані не представлені).

Аналіз сироватки і плазми мишей MASP-2/- чітко продемонстрував, що MASP-2 необхідний для активації комплементу через лектиновий шлях. Однак повна відсутність функціональної активності лектинового шляху не торкалася інші шляхи активації комплементу: плазма MASP-2/- вся ще була здатна активувати комплемент через класичний (ФІГУРА 26A) і альтернативний шлях (ФІГУРА 26B). На ФІГУРАХ 26A і 26B символом "*" позначена сироватка від ДТ (MASP-2 (+/+)); символом "●" позначена сироватка від ДТ (виснажена по C1q); символом "□" позначена сироватка від MASP-2 (-/-); і символом "Δ" позначена сироватка від MASP-2 (-/-) (виснажена по C1q).

На ФІГУРІ 26A наведений графік, що показує, що у мишей MASP-2/- зберігається функціональний класичний шлях: відкладення C3b аналізували на планшетах для мікротитрування, покритих імунними комплексами (отриманими *in situ* шляхом нанесення BSA, з подальшим доданням анти-BSA IgG кози). На ФІГУРІ 26B наведений графік, що показує, що у мишей з дефіцитом MASP-2 зберігається функціональний альтернативний шлях: відкладення C3b аналізували на покритих зимозаном планшетах для мікротитрування в умовах, що допускають лише альтернативний шлях активації (буфер, що містить Mg²⁺ і EGTA). Результати, представлені на ФІГУРІ 26A і ФІГУРІ 26B, являють собою середні значення для двох повторів і є репрезентативними для трьох незалежних експериментів. Всюди використані одні і ті ж символи для джерел плазми. Ці результати показують, що функціональний альтернативний шлях є у мишей з дефіцитом MASP-2, про що свідчать результати, представлені на ФІГУРІ 26B в експериментальних умовах, розроблених для прямої ініціації альтернативного шляху, і при цьому інактивації як класичного шляху, так і лектинового шляху.

Лектиновий шлях активації комплементу вносить важливий внесок в запальну втрату тканини при ішемії/реперфузійному ушкодженні міокарда (MIRI).

Для вивчення внеску функціональної активності лектинового шляху в MIRI автори винаходу порівнювали мишей MASP-2/- і контрольних однопонощиків ДТ в моделі MIRI після тимчасової оклюзії і реперфузії лівої передньої низхідної гілки коронарної артерії (LAD). Наявність або відсутність C4 комплементу не впливала ніякого чином на ступінь ішемічної втрати тканини при MIRI. Автори винаходу оцінювали вплив дефіциту C4 на розміри вогнища омертвіння після експерименту з MIRI. Як показано на ФІГУРІ 27A і ФІГУРІ 27B, ідентичні вогнища омертвіння мали місце як у мишей з дефіцитом C4, так і у їх однопонощиків ДТ. На ФІГУРІ 27A наведений графік, що показує індуковану MIRI втрату тканини після оклюзії LAD і реперфузії у мишей C4/- (n=6) і відповідних контрольних однопонощиків ДТ (n=7). На ФІГУРІ 27B наведений графік, що показує ІНФ залежно від ДПР, що чітко показує, що миші C4/- також схильні MIRI, як і їх контролю ДТ (пунктирна лінія).

Ці результати показують, що миші з дефіцитом C4 не захищені від MIRI. Цей результат був несподіваним, оскільки він суперечить широко поширеній думці, що основний фрагмент, що утворюється внаслідок активації C4, C4b, є необхідним компонентом C3-конвертази C4b2a класичного і лектинового шляху. Внаслідок цього, автори винаходу вивчили, чи може бути виявлена залишкова специфічна для лектинового шляху активація C3 в плазмі у мишей з дефіцитом C4 і в людській плазмі.

Лектиновий шлях може активувати C3 комплементу при відсутності C4 через новий залежний від MASP-2 шлях активації в обхід C4.

Що Надихнулися ранніми повідомленнями, вказуючими на існування шляхи активації в обхід C4 в сироватці морської свинки з дефіцитом C4 (May, J.E., and M. Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973)), автори винаходу проаналізували, чи може у мишей з дефіцитом C4 зберігатися залишкова функціональна активність класичного або лектинового шляху, і провели моніторинг активації C3 в умовах, специфічних для шляхів активації комплементу, що виключають внесок альтернативного шляху.

Відкладення C3b аналізували на покритих мананом планшетах для мікротитрування з використанням рекальцинованої плазми з концентраціями плазми, що виключають альтернативний шлях активації (1,25 % і нижче). У той час як ніяку розщеплення C3 не було виявлено в дефіцитній по C4 плазмі, тестованій на активацію класичного шляху (дані не представлені), сильну залишкову активність розщеплення C3 спостерігали в плазмі мишей з дефіцитом C4 при ініціації активації комплементу через лектиновий шлях. Залежність від лектинового шляху продемонстрована на основі конкурентного інгібування розщеплення C3

після преінкубації дефіцитної по C4 розбавленої плазми з розчинним мананом (дивись ФІГУРУ 28A). Як показано на ФІГУРАХ 28A-D, MASP-2-залежна активація C3 мала місце при відсутності C4. На ФІГУРІ 28A наведений графік, що показує відкладення C3b з використанням C4+/+ (хрести) і C4-/- (незаштриховані кружки) мишачої плазми. Преінкубація C4-/- плазми з лишком (1 мкг/мл) рідкофазного манану перед проведенням аналізу приводила до повного інгібування відкладення C3 (заштриховані кружки). Результати є репрезентативними для 3 незалежних експериментів. На ФІГУРІ 28B наведений графік, що показує результати експерименту, в якому дикого типу, дефіцитну по MASP-2 (незаштриховані квадрати) і C4-/- мишачу плазму (1 %) змішували з мАт М11 проти щурячого MASP-2 в різних концентраціях (абсциса), і відкладення C3b аналізували на покритих мананом планшетах. Результати являють собою середні значення ($\pm$ SD) з 4 аналізів (дублікати з 2 для кожного типу плазми). На ФІГУРІ 28C наведений графік, що показує результати експерименту з використанням людської плазми: об'єднаної НЛС (хрести), плазми C4-/- (незаштриховані кружки) і плазми C4-/- (заштриховані кружки), преінкубованою з 1 мкг/мл розчином манану. Результати є репрезентативними для трьох незалежних експериментів. На ФІГУРІ 28D наведений графік, що показує інгібування відкладення C3b в тій, що містить достатню кількість C4 і дефіцитної по C4 людській плазмі (1 %) мАт Н3 проти людського MASP-2 (середні значення $\pm$ SD з трьох повторів). Як показано на ФІГУРІ 28B, в плазмі MASP-2-/-, проаналізованої паралельно, був відсутній залежна від лектинового шляху активація C3, це вказує на те, що даний шлях активації C3 в обхід C4 є MASP-2-залежним.

Для додаткового підтвердження даних результатів автори винаходу створили серію рекомбінантних інгібуючих мАт, виділених з фагово-дисплейних бібліотек антитіл шляхом скринінгу на афінне зв'язування з рекомбінантним людським і щурячим MASP-2A (в якому залишок серину в активному домені протеази був замінений залишком аланіну методом сайт-направленого мутагенезу для запобігання аутолітичного розщепленню антигена). Рекомбінантні антитіла проти MASP-2 (Ат Н3 і Ат М11) були виділені з комбінаторних бібліотек антитіл (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)) з використанням рекомбінантного людського і щурячого MASP-2A як антигенів (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). Fab2 фрагмент проти щурячого білка, який сильно інгібував опосередковану лектиновим шляхом активацію C4 і C3 в плазмі мишей ($IC_{50} \sim 1$ нМ) був перетворений в повнорозмірне IgG2a антитіло. Поліклональна імунна сироватка проти мишачого MASP-2A була отримана у щурів. Ці інструменти дозволили авторам винаходу підтвердити залежність від MASP-2 даного нового, специфічного для лектинового шляху, шляху активації C3 в обхід C4, як додатково описано нижче.

Як показано на ФІГУРІ 28B, M211, інгібуюче моноклональне антитіло, яке вибірково зв'язує мишачий і щурячий MASP-2, інгібувало активацію C3 в обхід C4 у мишей з дефіцитом C4, а також активацію C3 в плазмі мишей ДТ через лектиновий шлях залежним від концентрації чином зі схожими значеннями IC_{50} . Всі аналізи виконували при високому розведенні плазми, що робить альтернативний шлях активації не функціональним (максимальна концентрація плазми становила 1,25 %).

Для з'ясування наявності аналогічної специфічної для лектинового шляху активації C3 в обхід C4 у людини, автори винаходу аналізували плазму донора з вродженим дефіцитом обох людських генів C4 (тобто, C4A і C4B), що приводить до повної відсутності C4 (Yang, Y., et al., J. Immunol. 173:2803-2814 (2004)). На ФІГУРІ 28C показано, що в плазмі даного пацієнта відбувається ефективна активація C3 при сильному розведенні плазми (що робить альтернативний шлях активації не функціональним). Специфічний для лектинового шляху характер активації C3 на покритих мананом планшетах продемонстрований для мишачої дефіцитної по C4 плазми (ФІГУРА 28A) і людської дефіцитної по C4 плазми (ФІГУРА 28C) шляхом додавання рідкофазного манану в надмірних концентраціях. Залежність від MASP-2 цього механізму активації C3 в людській дефіцитній по C4 плазмі оцінювали з використанням Ат Н3, моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язує людський MASP-2 і усуває функціональну активність MASP-2. Як показано на ФІГУРІ 28D, Ат Н3 інгібувало відкладення C3b (і C3dg) в людській плазмі як з достатнім змістом C4, так і з дефіцитом C4, з порівнянню ефективністю.

Для оцінки можливої ролі інших компонентів комплексу в активації C3 в обхід C4 автори винаходу протестировали плазму мишей MASP-1/3-/- і Bf/C2-/- нарівні з плазмою MASP-2-/-, C4-/- і C1q-/- (як контролі) в умовах, як специфічних як для лектинового шляху, і так і специфічних для класичного шляху. Будували графік для кількості розщепленого C3 відносно кількості відкладеного продукту C3 при використанні плазми ДТ.

На ФІГУРІ 29A наведений графік, що показує результати порівняльного аналізу активності C3-конвертази в плазмі різних ліній мишей з дефіцитом компонентів комплексу,

протестованої в умовах аналізу, специфічних або для лектинового шляху активації, або для класичного шляху активації. Розбавлені зразки плазми (1 %) мишей ДТ (n=6), мишей MASP-2/- (n=4), мишей MASP-1/3/- (n=2), мишей C4/- (n=8), мишей C4/MASP-1/3/- (n=8), мишей Bf/C2/- (n=2) і мишей C1q/- (n=2) тестували паралельно. Додавання в плазму Bf/C2/- 2,5 мкг/мл рекомбінантного щурячого C2 (Bf/C2/- + C2) приводило до відновлення відкладення C3b. Результати є середніми значеннями ($\pm$ SD), $^{**}p < 0,01$ (порівняно з плазмою ДТ). Як показано на ФІГУРІ 29А, значне відкладення C3 спостерігається в плазмі C4/-, протестованої в умовах, специфічних для лектинового шляху, але не в умовах, специфічних для класичного шляху. Знов-таки, відкладення C3 було відсутнє в дефіцитній по MASP-2 плазмі у випадку лектинового шляху активації, при цьому в тій же плазмі відбувалося відкладення C3 через класичний шлях. У плазмі MASP-1/3/- відкладення C3 відбувалося в умовах, специфічних як для лектинового, так і для класичного, шляхів. Не спостерігали відкладення C3 в плазмі з комбінованим дефіцитом C4 і MASP-1/3, при використанні умов, специфічних як для лектинового шляху, так і для класичного шляху. Було відсутнє відкладення C3, що піддається виявленню, в плазмі C2/Bf/-, як у випадку лектинового шляху, так і у випадку класичного шляху. Однак додавання в мишачу плазму C2/Bf/- рекомбінантного C2 приводило до відновлення опосередкованого як лектиновим шляхом, так і класичним шляхом, розщеплення C3. Умови аналізу валідували з використанням плазми C1q/-.

На ФІГУРІ 29В наведений графік, що показує кінетику з часовим розділенням активності C3-конвертази в плазмі від різних ліній мишей з дефіцитом компонентів комплементу, плазмі ДТ, fB/-, C4/-, MASP-1/3/- і MASP-2/-, протестованих в умовах специфічних для лектинового шляху активації (1 % плазма, результати є репрезентативними для трьох незалежних експериментів). Як показано на ФІГУРІ 29В, хоча розщеплення C3 було відсутнє в плазмі MASP-2/-, в плазмі fB/- відбувалося розщеплення C3 з кінетикою, аналогічній кінетиці в плазмі ДТ. Значну відстрочку залежного від лектинового шляху перетворення C3 в C3b (і C3dg) спостерігали в плазмі C4/-, а також в плазмі, дефіцитній по MASP-1/3. Ця відстрочка активації C3 в плазмі MASP-1/3/-, як нещодавно показано, є залежною від MASP-1, а не від MASP-3 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)).

Обговорення

Результати, описані в даному прикладі, переконливо свідчать на користь того, що функціональна активність MASP-2 надзвичайно важлива для активації C3 через лектиновий шлях, як в присутності, так і при відсутності, C4. Крім того, C2 і MASP-1 необхідні для функціонування цього нового, специфічного для лектинового шляху, шляху активації C3 в обхід C4. Порівняльний аналіз функціональної активності лектинового шляху в плазмі MASP-2/-, а також C4/-, виявив наявність раніше невідомого, незалежного від C4, але залежного від MASP-2, шляху активації C3 комплементу і показав, що C3 може бути активований залежним від лектинового шляху чином при повній відсутності C4. Хоч детальний молекулярний склад і послідовність подій активації цього нового MASP-2-залежного шляху перетворення C3 ще має бути з'ясувати, результати авторів винаходу дозволяють передбачити, що для даного шляху активації в обхід C4 також необхідна наявність C2 комплементу і MASP-1. Втрату опосередкованої лектиновим шляхом активності розщеплення C3 в плазмі мишей з комбінованим дефіцитом C4 і MASP-1/3 можна пояснити зовсім нещодавно описаною роллю MASP-1 в посиленні MASP-2-залежної активації комплементу за рахунок прямого розщеплення і активації MASP-2 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)). Аналогічно, MASP-1 може сприяти функціональній активності MASP-2 за рахунок його здатності до розщеплення C2 (Moller-Kristensen, et al., Int. Immunol. 19:141-149 (2007)). Цією двома активністю можна пояснити зниження швидкості, з якою дефіцитна по MASP-1/3 плазма розщеплює C3 через лектиновий шлях активації, і причину, по якій MASP-1 може бути необхідний для підтримки перетворення C3 через шлях активації в обхід C4.

Нездатність плазми C2/fB/- до активації C3 через лектиновий шлях, як показано, є C2-залежною, оскільки додавання рекомбінантного щурячого C2 до плазми C2/fB/- приводило до відновлення здатності відновленої плазми до активації C3 на покритих мананом планшетах.

Той факт, що дефіцит C4 приводить до специфічного порушення класичного шляху активації комплементу, в той час як лектиновий шлях зберігає фізіологічно критичний рівень активності C3-конвертази через MASP-2-залежний шлях активації в обхід C4, служить основою для переоцінки ролі лектинового шляху в різних моделях захворювань, включаючи експериментальне інфікування *S. pneumoniae* (Brown, J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:16969-16974 (2002); експериментальний алергічний енцефаломієліт (Boos, L.A., et al., Glia 49:158-160 (2005); а також моделі C3-залежної регенерації мишачої печінки (Clark, A., et al., Mol. Immunol. 45:3125-3132 (2008)). Автори останньої роботи продемонстрували, що у мишей з

дефіцитом C4 може відбуватися активація C3 незалежним від альтернативного шляху чином, оскільки *in vivo* інгібування альтернативного шляху за рахунок опосередкованого антитілом пригнічення функціональної активності фактора В не впливало на залежне від розщеплення C3 відновлення печінки у мишей C4^{-/-} (Clark, A., et al. (2008)). Дана опосередкована лектиновим шляхом активація C3 в обхід C4 може також пояснити відсутність захисного фенотипу, пов'язаного з дефіцитом C4, в моделі MIRI авторів винаходу, а також в раніше описаній моделі відторгання алотрансплантата нирки (Lin, T., et al., *Am. J. Pathol.* 168:1241-1248 (2006)). Навпаки, ранні результати авторів винаходу незалежно продемонстрували значною мірою захисний фенотип у мишей MASP-2^{-/-} в моделях трансплантації нирки (Farrar, C.A., et al., *Mol. Immunol.* 46:2832 (2009)).

Підводячи підсумок, результати, описані в даному прикладі, свідчать на користь того, що MASP-2-залежна активація C3 в обхід C4 є фізіологічно значущим механізмом, який може бути важливий в умовах, коли доступність C4 обмежує активацію C3.

Приклад 23

У даному прикладі описана активація C3 тромбіновими субстратами і відкладення C3 на манані у мишей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) і C4 (-/-).

Обґрунтування

Як описано в прикладі 14, було встановлено, що активація тромбіну може відбуватися після активації лектинового шляху в фізіологічних умовах, і була продемонстрований ступінь залученості MASP-2. C3 відіграє центральну роль в активації системи комплементу. Активація C3 необхідна як для класичного, так і для альтернативного, шляхів активації комплементу. Був проведений експеримент для визначення того, чи активується C3 тромбіновими субстратами.

Методи

Активація C3 тромбіновими субстратами

Активують C3 вимірювали в присутності наступних активованих форм тромбінових субстратів; людського FCXIa, людського FVIIa, бичачого FXa, людського FXa, людського активованого білка C і людського тромбіну. C3 інкубували з різними тромбіновими субстратами, потім розділяли в відновлювальних умовах в 10 % SDS-поліакриламідних гелях. Після електрофоретичного перенесення на целюлозну мембрану, мембрану інкубували з моноклональним біотинильованим щурячим антитілом проти мишачого C3, з виявленням за допомогою набору з кон'югатом стрептавідин-HRP і розвитком забарвлення за рахунок реагенту ECL.

Результати

Активація C3 включає розщеплення інтактного α -ланцюга на укорочений α' -ланцюг і розчинний C3a (не показано на ФІГУРІ 30). На ФІГУРІ 30 представлені результати вестерн-блот аналізу активації людського C3 тромбіновими субстратами, при цьому нерозщеплений альфа-ланцюг C3 і продукт активації α' -ланцюг вказані стрілками. Як показано на ФІГУРІ 30, інкубація C3 з активованими формами людських факторів коагуляції XI і X, а також активованим бичачим фактором коагуляції X, може приводити до розщеплення C3 *in vitro* при відсутності яких-небудь протеаз комплементу.

Відкладення C3 на манані

Аналізи відкладення C3 проводили із зразками сироватки, отриманими від мишей ДТ, MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) і C4 (-/-). F11 являє собою ген, що кодує фактор коагуляції XI. Для вимірювання активації C3 планшети для мікротитрування покривали мананом (1 мкг/ямку), потім додавали овечу анти-HSA сироватку (2 мкг/мл) в TBS/Tween/Ca²⁺. Планшети блокували 0,1 % HSA в TBS і промивали, як описано вище. Зразки плазми розбавляли в 4 mM розчині барбіталу з 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4, додавали в планшети і інкубували протягом 1,5 год. при 37 °C. Після промивання пов'язаний C3b виявляли за допомогою кролячого антитіла проти людського C3c (Dako), з подальшим використанням кон'югованого з лужною фосфатазою антитіла кози проти IgG кролика і pNPP.

Результати

На ФІГУРІ 31 представлені результати аналізу відкладення C3 з використанням образів сироватки, отриманих від мишей ДТ, MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) і C4 (-/-). Як показано на ФІГУРІ 31, функціональний лектиновий шлях має місце навіть при повній відсутності C4. Як також показано на ФІГУРІ 31, для цієї нової залежної від лектинового шляху активації комплементу необхідний фактор коагуляції XI.

Обговорення

До отримання результатів даного експерименту фахівці в даній галузі вважали, що для активності лектинового шляху комплементу необхідний C4. Внаслідок цього, дані, отримані для мишей з нокаутом C4 (і для людей з дефіцитом C4), були інтерпретовані з припущенням, що у

таких організмів відсутній лектиновий шлях (крім відсутності класичного шляху). Дані результати показують, що це припущення не вірне. Таким чином, висновки з минулих досліджень, що передбачають, що лектиновий шлях не важливий при деяких захворюваннях, виходячи з фенотипу тварин з дефіцитом C4, можуть бути помилковими. Дані, описані в цьому прикладі, також демонструють, що в фізіологічному контексті суцільної сироватки лектиновий шлях може активувати компоненти каскаду коагуляції. Таким чином, показано, що має місце взаємодія між комплекментом і коагуляцією з участю MASP-2.

Приклад 24

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла на лізис еритроцитів в зразках крові, отриманих від пацієнтів з пароксизмальною нічною гемоглобінурією (PNH).

Передумови/обґрунтування

Пароксизмальна нічна гемоглобінурія (PNH), яка також називається синдромом Маркіафаві-Мікелі, являє собою набуте, потенційно загрозливе життю захворювання крові, що характеризується індукованою комплекментом внутрішньосудинною гемолітичною анемією. Характерною особливістю PNH є хронічний внутрішньосудинний гемоліз, який є наслідком підвищеної активації альтернативного шляху комплекменту. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010). Анемія при PNH є наслідком руйнування еритроцитів в кровотоці. Симптоми PNH включають червону сечу внаслідок появи гемоглобіну в сечі і тромбоз. PNH може розвиватися самостійно, її називають "первинною PNH", або в контексті інших захворювань кісткового мозку, таких як апластична анемія, її називають "вторинною PNH". Лікування PNH включає переливання крові від анемії, використання антикоагулянтів від тромбозу і використання моноклонального антитіла екулізумабу (солірис), яке захищає клітини крові від імунного руйнування за рахунок інгібування системи комплекменту (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). Однак у значної частини пацієнтів з PNH, що отримували екулізумаб, зберігається клінічно значуща опосередкована імунною системою гемолітична анемія, оскільки антитіло не блокує активацію альтернативного шляху комплекменту.

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла на лізис еритроцитів із зразків крові, отриманих від пацієнтів з PNH (які не отримували солірис), які інкубують з співпадаючою по ABO підкисленою нормальною людською сироваткою.

Методи

Реагенти

Еритроцити від здорових донорів і від пацієнтів, які страждають на PNH (які не отримували солірис), отримують шляхом проколу вени, і готують, як описано в публікації Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання. Анти-MASP-2 антитіла з функцією блокування активності лектинового шляху можуть бути отримані, як описано в прикладі 10.

Аналіз гемолізу:

Спосіб визначення ефекту анти-MASP-2 антитіл на здатність блокувати гемоліз еритроцитів пацієнтів з PNH здійснюють з використанням методів, описаних в публікаціях Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11):2283-91 (2010) і Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), зміст обох з яких включено в цей документ за допомогою посилання. Як описано в публікації Lindorfer et al., еритроцити із зразків від пацієнтів з PNH центрифугують, світлий шар кров'яного згустку видаляють аспірацією, і клітини промивають в желатин-вероналовому буфері (GVB) перед кожним експериментом. Еритроцити тестують на схильність APC-опосередкованому лізису таким чином. Співпадаючу по ABO нормальну людську сироватку розбавляють GVB, що містить 0,15 mM CaCl₂ і 0,5 mM MgCl₂ (GVB+2), підкислюють до pH 6,4 (підкислена НЛС, кНЧС) і використовують для відновлення еритроцитів до гематокриту 1,6 % в 50 % кНЧС. Потім суміші інкубують при 37 °C, і через 1 годину еритроцити осаджують центрифугуванням. Оптичну густину аліквоти відновленого супернатанта вимірюють при 405 нМ і використовують для розрахунку лізису, у відсотках. Зразки, відновлені в підкисленій сироватці-ЕДТА, обробляють аналогічно і використовують для визначення фонового не опосередкованого комплекментом лізису (як правило, менше 3 %). Повний лізис (100 %) визначає після інкубації еритроцитів в дистильованій воді.

Для визначення ефекту анти-MASP-2 антитіл на гемоліз PNH еритроцитів, еритроцити від пацієнтів з PNH інкубують в кНЧС в присутності анти-MASP-2 антитіл в ступінчасто зростаючих концентраціях, а потім кількісно визначають наявність/ступінь гемолізу.

У зв'язку з тим фактом, що анти-MASP-2 антитіла, як показано, блокують подальшу активацію альтернативного шляху комплекменту, очікується, що анти-MASP-2 антитіла будуть ефективні для блокування опосередкованого альтернативним шляхом гемолізу PNH

еритроцитів, і будуть корисні як терапевтичний засіб для лікування пацієнтів, які страждають на PNH.

Приклад 25

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 блокуючого антитіла на активацію комплементу кріоглобулінами в зразках крові, отриманих від пацієнтів, які страждають на кріоглобулінемії.

Передумови/обґрунтування

Кріоглобулінемія характеризується наявністю кріоглобулінів в сироватці. Кріоглобуліни являють собою одиночні або змішані імуноглобуліни (як правило, IgM антитіла), які зазнають оборотну агрегацію при низьких температурах. Агрегація приводить до активації класичного шляху комплементу і запалення в судинному руслі, зокрема, на периферії. Клінічні вияви кріоглобулінемії включають васкуліт і гломерулонефрит.

Кріоглобулінемія може бути класифікована таким чином залежно від складу кріоглобулінів: кріоглобулінемія I типу, або проста кріоглобулінемія, є результатом моноклонального імуноглобуліну, як правило, імуноглобуліну M (IgM); кріоглобулінемія II і III типів (змішана кріоглобулінемія) включає ревматоїдні фактори (RF), які, як правило, являють собою IgM в комплексах з Fc-областю поліклональних IgG.

Стани, пов'язані з кріоглобулінемією, включають інфекцію гепатиту C, лімфопроліферативні захворювання і інші аутоімунні захворювання. Кріоглобулін-вмісні імунні комплекси приводять до клінічного синдрому системного запалення, можливо, внаслідок їх здатності до активації комплементу. Хоча IgG імунні комплекси звичайно активують класичний шлях комплементу, IgM-вмісні комплекси також можуть активувати комплемент через лектиновий шлях (Zhang, M., et al., *Mol Immunol* 44(1-3):103-110 (2007) і Zhang, M., et al., *J. Immunol.* 177(7):4727-34 (2006)).

Імуногістохімічні дослідження додатково продемонстрували, що кріоглобулінові імунні комплекси містять компоненти лектинового шляху, і в біопсійних зразках від пацієнтів з кріоглобулінемічним гломерулонефритом було виявлено імуногістохімічний доказ активації лектинового шляху *in situ* (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol* 101(1):59-66 (2001)). Ці результати свідчать про те, що лектиновий шлях може вносити внесок в запалення і несприятливі виходи при кріоглобулінемічних захворюваннях.

Методи

Спосіб визначення ефекту анти-MASP-2 антитіла на можливість блокування несприятливих ефектів кріоглобулінемії здійснюють з використанням аналізу на рідкофазне перетворення C3, описаного в публікації Ng Y.C. et al., *Arthritis and Rheumatism* 31(1):99-107 (1988), зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання. Як описано в публікації Ng et al., при есенційній змішаній кріоглобулінемії (EMC), моноклональний ревматоїдний фактор (mRF), як правило IgM, утворює комплекс з поліклональними IgG, з формуванням кріопреципітатних імунних комплексів (IC) (кріоглобулін II типу). Імуноглобуліни і C3 були виявлені в стінках судин в уражених тканинах, таких як шкіра, нерви і нирки. Як описано в публікації Ng et al., 125I-мічений mRF додають до сироватки (нормальної людської сироватки і сироватки, отриманої від пацієнтів, які страждають на кріоглобулінемію), інкубують при 37 °C і вимірюють зв'язування з еритроцитами.

Рідкофазне перетворення C3 визначають в сироватці (нормальній людській сироватці і сироватці, отриманій від пацієнтів, які страждають на кріоглобулінемії) в присутності або при відсутності наступних IC: BSA-анти BSA, mRF, mRF плюс IgG або кріоглобуліни, в присутності або при відсутності анти-MASP-2 антитіла. Фіксацію C3 і C4 до IC вимірюють з використанням аналізу спільної преципітації з F(ab')₂ анти-C3 і F(ab')₂ анти-C4.

У зв'язку з тим фактом, що анти-MASP-2 антитіла, як показано, блокують активацію лектинового шляху, очікується, що анти-MASP-2 антитіла будуть ефективні в блокуванні опосередкованих комплементом несприятливих ефектів, пов'язаних з кріоглобулінемією, і будуть корисні як терапевтичні засоби для лікування пацієнтів, страждаючі від кріоглобулінемії.

Приклад 26

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла на зразки крові, отримані від пацієнтів, які страждають на хвороби холодових аглютинінів, яка виявляється у вигляді анемії.

Передумови/обґрунтування

Хвороба холодових аглютинінів (CAD) є різновидом аутоімунної гемолітичної анемії. Антитіла холодові аглютиніни (як правило, IgM) активуються низькими температурами і зв'язують, а також агрегують еритроцити. Антитіла холодові аглютиніни в поєднанні з комплементом атакують антиген на поверхні еритроцитів. Це приводить до опсонізації еритроцитів (гемоліз), який ініціює їх кліренс ретикулоендотеліальною системою. Температура,

при якій відбувається аглютинація, відрізняється у різних пацієнтів.

CAD виявляється як анемія. Коли швидкість руйнування еритроцитів перевищує здатність кісткового мозку виробляти достатню кількість клітин, що переносять кисень, розвивається анемія. CAD може бути викликана основним захворюванням або порушенням, її називають "вторинною CAD", основним захворюванням може бути інфекційне захворювання (пневмонія, що викликається мікоплазмою, інфекційний паротит, мононуклеоз), лімфопроліферативне захворювання (лімфома, хронічний лімфоцитарний лейкоз) або захворювання сполучної тканини. Вважається, що пацієнти з первинною CAD мають слабковиражене лімфопроліферативне захворювання кісткового мозку. Як первинна, так і вторинна, CAD є набутими станами.

Методи

Реагенти

Еритроцити від здорових донорів і від пацієнтів, які страждають на CAD, отримують шляхом проколу вени. Анти-MASP-2 антитіла з функцією блокування активності лектинового шляху можуть бути отримані, як описано в прикладі 10.

Здатність анти-MASP-2 антитіл блокувати опосередковану холодовими аглютинінами активацію лектинового шляху можна визначати таким чином. Еритроцити пацієнтів з групою крові I сенсibilізують холодовими аглютинінами (тобто, IgM антитілами) в присутності або при відсутності анти-MASP-2 антитіл. Потім еритроцити тестують на здатність активувати лектиновий шлях, вимірюючи зв'язування C3.

У зв'язку з тим фактом, що анти-MASP-2 антитіла, як показано, блокують активацію лектинового шляху, очікується, що анти-MASP-2 антитіла будуть ефективні в блокуванні опосередкованих комплементом несприятливих ефектів, пов'язаних з хворобою холодових аглютинінів, і будуть корисні як терапевтичні засоби для лікування пацієнтів, страждаючі від хвороби холодових аглютинінів.

Приклад 27

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла на лізис еритроцитів в зразках крові, отриманих від мишей з атиповим гемолітичним уремичним синдромом (aHUS).

Передумови/обґрунтування

Атиповий гемолітичний уремичний синдром (aHUS) характеризується наявністю гемолітичної анемії, тромбоцитопенії і ниркової недостатності внаслідок тромбоцитарних тромбів в мікроваскулярній мережі нирки і інших органів. aHUS зв'язаний з порушеною регуляцією комплементу, і може бути або спорадичним, або сімейним. Сімейні випадки aHUS пов'язані з мутаціями в генах, що кодують білки, відповідальні за активацію комплементу, включаючи фактор Н комплементу, мембранний кофактор В і фактор І, а також зв'язаний з фактором Н комплементу білок 1 (CFHR1) і зв'язаний з фактором Н комплементу білок 3 (CFHR3). Zipfel, P.F., et al., PLoS Genetics 3(3):e41 (2007). У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла на лізис еритроцитів із зразків крові, отриманих від мишей з aHUS.

Методи

Здатність анти-MASP-2 антитіл до лікування aHUS можна визначати в моделі даного захворювання на мишах, у яких ендogenous мишачий ген fH замінений людським гомологом, що кодує мутантну форму fH, що часто зустрічається у пацієнтів з aHUS. Дивись публікацію Pickering M.C. et al., J. Exp. Med. 204(6):1249-1256 (2007), зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання. Як описано в публікації Pickering et al., у таких мишей розвивається aHUS-подібна патологія. Для оцінки можливості використання анти-MASP-2 антитіла для лікування aHUS, анти-MASP-2 антитіла вводять мутантним мишам з aHUS і порівнюють лізис еритроцитів в зразках від анти-MASP-2 Ат, що отримували і Ат контролів, що не отримували. У зв'язку з тим фактом, що анти-MASP-2 антитіла, як показано, блокують активацію лектинового шляху, очікується анти-MASP-2 антитіла будуть ефективні в блокуванні лізиса еритроцитів у суб'єктів-ссавців, які страждають на aHUS.

Приклад 28

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту анти-MASP-2 антитіла в лікуванні глаукоми.

Обґрунтування/передумова

Показано, що активація, що неконтролюється комплементу вносить внесок в прогресування дегенеративного пошкодження гангліозних клітин сітківки (RGC), їх синапсів і аксонів при глаукомі. Дивись Tezel G. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 51:5071-5082 (2010). Наприклад, гістопатологічні дослідження людських тканин і in vivo дослідження з використанням різних тваринних моделей показали, що в глаукоматозній сітківці синтезуються компоненти

комплемента, включаючи C1q і C3, і утворюється термінальний комплекс комплемента (дивись Stasi K. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., Exp Eye Res 83:620-628 (2006)). Як також описано в публікації Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008), синтез і відкладення компонентів комплемента індукуються I/R сітківки, і порушення каскаду комплемента приводить до відстрочки дегенерації RGC. У даному дослідженні у мишей, у яких направлено зруйнований компонент C3 комплемента, як показано, має місце відстрочка дегенерації RGC після тимчасової I/R сітківки порівняно з нормальними контрольними тваринами.

Методи

Спосіб визначення ефекту анти-MASP-2 антитіла на дегенерацію RGC здійснюють з використанням тваринної моделі I/R сітківки, описаної в публікації Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008), зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання. Як описано в публікації Kuehn et al., ішемію сітківки індукують, після анестезії тварини, шляхом введення голки 30 калібру, сполученої з резервуаром, що містить фосфатно-сольовий буфер, через рогівку в передню камеру ока. Потім резервуар з сольовим розчином підіймають, підвищуючи внутрішньоочний тиск до 104 мм рт. ст., що досить для повного запобігання циркуляції в судинній мережі сітківки. У наявності підвищеної внутрішньоочної ішемії переконуються на основі збліднення райдужки і сітківки, і ішемію підтримують протягом 45 хвилин тільки в лівому оку; праве око служить як контроль і залишається без канюляції. Потім мишей умертвляють через 1 або 3 тижні після ішемічного інсульту. Анти-MASP-2 антитіла вводять мишам або локально, в око, або системно, для оцінки ефекту анти-MASP антитіла, введеного до ішемічного інсульту.

Проводять імуногістохімічне дослідження очей з використанням антитіл проти C1q і C3 для виявлення відкладення компонентів комплемента. Пошкодження зорового нерва також можна оцінювати стандартними методами електронної мікроскопії. Кількісне визначення RGC сітківки, що вижили проводять з використанням мічення гамма-синуклеїном.

Результати

Як описано в публікації Kuehn et al., у нормальних контрольних мишей тимчасова ішемія сітківки приводить до дегенеративних змін зорового нерва і відкладення в сітківці C1q і C3, яке може бути виявлене методами імуногістохімії. Навпаки, у мишей з дефіцитом C3 спостерігається помітне зменшення дегенерації аксонів і лише незначні рівні пошкодження зорового нерва через 1 тиждень після індукції. Виходячи з даних результатів, очікується, що аналогічні результати мали б місце при проведенні даного аналізу на мишах з нокаутом MASP-2 і введенні анти-MASP-2 антитіл нормальним мишам перед ішемічним інсультом.

Приклад 29

Даний приклад показує, що інгібітор MASP-2, такий як анти-MASP-2 антитіло, ефективний для лікування наслідків опромінення і/або для лікування, полегшення або запобігання гострому променевому синдрому.

Обґрунтування

Вплив високих доз іонізуючого випромінювання викликає загибель по двох механізмах: токсичність для кісткового мозку і шлунково-кишковий синдром. Токсичність для кісткового мозку приводить до падіння числа всіх клітин крові, привертаючи організм до смерті внаслідок інфекції і кровотечі. Шлунково-кишковий синдром є більш важким станом і зумовлений втратою функції кишкового бар'єра через руйнування шару кишкового епітелію і втрати ендокринної функції кишечника. Це приводить до сепсису і пов'язаного синдрому системної запальної відповіді, який може приводити до смерті.

Лектиновий шлях комплемента є вродженим імунним механізмом, який ініціює запалення у відповідь на пошкодження тканини і вплив чужорідних поверхонь (тобто, бактерій). Блокування цього шляху приводить до кращих виходів в мишачих моделях ішемічного пошкодження тканини кишечника або септичного шоку. Передбачається, що лектиновий шлях може спричиняти надмірне і шкідливе запалення у відповідь на індуковане опроміненням пошкодження тканин. Блокування лектинового шляху може, таким чином, зменшувати вторинні пошкодження і приводити до збільшення виживаності після гострого радіаційного ураження.

Метою дослідження, що проводиться, як описано в даному прикладі, була оцінка ефекту блокування лектинового шляху шляхом введення антитіл проти мишачого MASP-2 на виживаність в мишачій моделі радіаційної ураження.

Матеріали і Методи

Матеріали. Тестованими препаратами в даному дослідженні були (i) високоафінне антитіло проти мишачого MASP-2 (мАт M11) і (ii) високоафінне антитіло проти людського MASP-2 (мАт H6), антитіла, що блокують білок MASP-2 - компонент лектинового шляху комплемента, які були

продуковані в трансфікованих клітинах ссавців. Концентрації при дозуванні становили 1 мг/кг антитіла проти мишачого MASP-2 (мАт М11), 5 мг/кг антитіла проти людського MASP-2 (мАт Н6), або стерильний сольовий розчин. Для кожної сесії дозування готували відповідний об'єм свіжих розчинів для дозування.

5 Тварини. Молодих дорослих самців мишей Swiss-Webster отримували від компанії Harlan Laboratories (Houston, TX). Тварини були розміщені в клітках з твердим дном, з підстилкою Alpha-Dri, і отримували сертифіковану дієту для гризунів PMI 5002 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) і воду без обмеження. Температуру в приміщенні для тварин контролювали, і підтримували світловий режим 12 годин світла/12 часів темряви.

10 Опромінення. Після 2-тижневої акліматизації в приміщенні мишей в групах по 10 опромінювали дозами 6,5 і 7,0 Гр шляхом опромінення всього тіла з інтенсивністю дози 0,78 Гр/хв, використовуючи систему Therapax X-RAD 320, оснащену високостабільним рентгенівським 320-кВ генератором, металокерамічною рентгенівською трубкою, змінним коліматором рентгенівських променів і фільтром (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT).
15 Рівні доз вибирали на основі попередніх досліджень, що проводяться з мишами тієї ж лінії, результати яких показали, що LD50/30 складає від 6,5 до 7,0 Гр (дані не представлені).

Формулювання і введення лікарського засобу. Відповідні об'єми концентрованих маточних розчинів розбавляли крижаним сольовим розчином, отримуючи розчини для дозування з концентраціями 0,2 мг/мл антитіла проти мишачого MASP-2 (мАт М11) або 0,5 мг/мл антитіла проти людського MASP-2 (мАт Н6), відповідно до протоколу. Введення анти-MASP-2 антитіл
20 мАт М11 і мАт Н6 проводили шляхом в/ч ін'єкції з використанням голки 25 калібру для доставки, виходячи з маси тіла тварини, 1 мг/кг мАт М11, 5 мг/кг мАт Н6 або сольового розчину.

Дизайн дослідження. Мишей випадковим чином розподіляли в групи, вказані в ТАБЛИЦІ 8. Масу тіла і температуру вимірювали і реєстрували щодня. Мишей в групах 7, 11 і 13 умертвляли в день 7 після опромінення, і кров збирали шляхом проколу серця під глибокою анестезією.
25 Тварин, що Вижили в день 30 після опромінення умертвляли таким же чином, і кров збирали. З зібраних зразків кров отримувала плазму відповідно до протоколу і повертала Спонсору для аналізу.

Таблиця 8:

ГРУПИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Група	N	Рівень опромінення (Гр)	Препарат	Схема дозування
1	20	6,5	Розчинник	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
2	20	6,5	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	Тільки 18 год. до опромінення
3	20	6,5	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
4	20	6,5	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	2 год. після опромінення, щотижневий бустер
5	20	6,5	Ат проти людського MASP-2 (мАт Н6)	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
6	20	7,0	Розчинник	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
7	5	7,0	Розчинник	Тільки 2 год. після опромінення
8	20	7,0	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	Тільки 18 год. до опромінення
9	20	7,0	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
10	20	7,0	Ат проти мишачого MASP-2	2 год. після опромінення, щотижневий бустер

Таблиця 8:

ГРУПИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Група	N	Рівень опромінення (Гр)	Препарат	Схема дозування
			(мАт М11)	
11	5	7,0	Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11)	Тільки 2 год. після опромінення
12	20	7,0	Ат проти людського MASP-2 (мАт Н6)	18 год. до опромінення, 2 год. після опромінення, щотижневий бустер
13	5	Немає	Немає	Немає

Статистичний аналіз. Будували криві виживаності Каплана-Мейєра і використовували для порівняння середнього часу виживання в різних групах лікування з використанням логарифмічного рангового критерію і критерію Вілкоксона. Представлені середні значення зі стандартним відхиленням, або середні значення зі стандартною помилкою середнього.

Результати

Графіки виживаності Каплана-Мейєра для груп тварин, опромінених 7,0 і 6,5 Гр, представлені на ФІГУРАХ 32А і 32В, відповідно, і дані підсумовувані нижче в ТАБЛИЦІ 9. Загалом, введення Ат проти мишачого MASP-2 (мАт М11) перед опроміненням приводило до збільшення виживаності опромінених мишей порівняно з тими, що отримували розчинник опроміненними контрольними тваринами при використанні обох рівнів опромінення 6,5 (збільшення 20 %) і 7,0 Гр (збільшення 30 %). При рівні опромінення 6,5 Гр введення після опромінення Ат проти мишачого MASP-2 приводило до помірного збільшення виживаності (15 %) порівняно з тими, що отримували розчинник контрольними опроміненними тваринами.

При порівнянні всі тварини, що отримували препарат в групі з рівнем опромінення 7,0 Гр демонстрували підвищену виживаність порівняно з тими, що отримували розчинник опроміненними контрольними тваринами. Найбільша зміна виживаності мала місце у тварин, що отримували мАт Н6, із збільшенням на 45 % порівняно з контрольними тваринами. Крім того, в групі з рівнем опромінення 7,0 Гр випадки смерті в групі, що отримувала мАт Н6, уперше спостерігали в день 15 після опромінення, порівняно з вдень 8 після опромінення в групі, що отримувала розчинник опромінених контрольних тварин; термін виживання був збільшений на 7 днів відносно контрольних тварин. Середній час до смерті у мишей, що отримували мАт Н6 ($27,3 \pm 1,3$ днів) було значно збільшено ($p=0,0087$) порівняно з контрольними тваринами ($20,7 \pm 2,0$ днів) в групі з рівнем опромінення 7,0 Гр.

Процентну зміну маси тіла порівняно з вдень перед опроміненням (день -1) реєстрували протягом всього дослідження. Тимчасове зниження маси тіла мало місце у всіх опромінених тварин, без ознак відмінних змін внаслідок лікування мАт М11 або мАт Н6 порівняно з контролем (дані не представлені). Після завершення дослідження у всіх тварин, що вижили спостерігали збільшення маси тіла від початкової маси тіла (день -1).

Таблиця 9:

СТУПІНЬ ВИЖИВАНOSTІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН, ПІДДАНИХ ОПРОМІНЕННЮ

Група дослідження	Рівень опромінення	Вживаність (%)	Час до смерті (середнє $\pm$ SEM, дні)	Перша/остання смерть (дні)
Контрольне опромінення	6,5 Гр	65 %	$24,0 \pm 2,0$	9/16
мАт М11 до опромінення	6,5 Гр	85 %	$27,7 \pm 1,5$	13/17
мАт М11 до+після опромінення	6,5 Гр	65 %	$24,0 \pm 2,0$	9/15
мАт М11 після	6,5 Гр	80 %	$26,3 \pm 1,9$	9/13

Таблиця 9:

СТУПІНЬ ВИЖИВАНOSTІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН, ПІДДАНИХ ОПРОМІНЕННЮ

Група дослідження	Рівень опромінення	Виживаність (%)	Час до смерті (середнє $\pm$ SEM, дні)	Перша/остання смерть (дні)
опромінення				
мАт Н6 до+після опромінення	6,5 Гр	65 %	24,6 $\pm$ 1,9	9/19
Контрольне опромінення	7,0 Гр	35 %	20,7 $\pm$ 2,0	8/17
мАт М11 до опромінення	7,0 Гр	65 %	23,0 $\pm$ 2,3	7/13
мАт М11 до+після опромінення	7,0 Гр	55 %	21,6 $\pm$ 2,2	7/16
мАт М11 після опромінення	7,0 Гр	70 %	24,3 $\pm$ 2,1	9/14
мАт Н6 до+після опромінення	7,0 Гр	80 %	27,3 $\pm$ 1,3*	15/20

* $p=0,0087$ при використанні двостороннього непарного критерію Стюдента для порівняння контрольних опромінених тварин і тварин, що отримували лікування, при одному і тому ж рівні опромінення.

Обговорення

Гострий променевий синдром складається з трьох чітких подсиндромів: гемопоетичного, шлунково-кишкового і цереброваскулярного. Синдром, що спостерігається, залежить від дози опромінення, при цьому гемопоетичні ефекти спостерігаються у людини при рівнях опромінення значної частини, або усього, тіла, перевищуючі 1 Гр. Гемопоетичний синдром характеризується важким придушенням функції кісткового мозку, що приводить до панцитопенії із зміною кількості клітин крові, еритроцитів і лейкоцитів, а також тромбоцитів, паралельно з пошкодженням імунної системи. У період крайнього занепаду з невеликою кількістю нейтрофілів і тромбоцитів в периферичній крові, нейтропенія, лихоманка, ускладнення сепсису і неконтрольована кровотеча приводять до смерті.

У цьому дослідженні було виявлено, що введення мАт Н6 приводить до збільшення виживаності при рентгенівському опроміненні всього тіла у самців мишей лінії Swiss-Webster при рівні опромінення 7,0 Гр. Примітно, що при рівні опромінення 7,0 Гр 80 % тварин, що отримували мАт Н6, виживали протягом 30 днів, порівняно з 35 % що отримували розчинник контрольних опромінених тварин. Важливо зазначити, що перший випадок смерті в цій групі лікування не відбувався до дня 15 після опромінення, це складає 7-денне збільшення відносно того, що мало місце у тих, що отримували розчинник контрольних опромінених тварин. Цікаво, що при більш низькій дозі рентгенівського опромінення (6,5 Гр) введення мАт Н6, судячи з усього, не впливало на термін виживання або відстрочку смерті порівняно з тими, що отримували розчинник контрольними опроміненими тваринами. Може бути декілька причин для цієї різниці в реакції між рівнями опромінення, хоч перевірка будь-якої гіпотези може зажадати додаткових досліджень, в тому числі проміжного збору зразків для мікробіологічного культивування і оцінки гематологічних параметрів. Одне з пояснень може полягати просто в тому, що через кількість тварин, віднесених до груп, можна було не побачити які-небудь тонкі відмінності, пов'язані з лікуванням. Наприклад, при розмірі груп $n=20$, різниця у виживаності між 65 % (мАт Н6 при рівні опромінення 6,5 Гр) і 80 % (мАт Н6 при рівні опромінення 7,0 Гр) становить 3 тварин. З іншого боку, різниця між 35 % (контроль з розчинником при рівні опромінення 7,0 Гр) і 80 % (мАт Н6 при рівні опромінення 7,0 Гр) становить 9 тварин, і надає переконливі докази відмінностей, пов'язаних з лікуванням.

Отримані результати показують, що анти-MASP-2 антитіла є ефективними в лікуванні суб'єкта-ссавця, що має ризик розвитку, або страждає від, руйнівної дії гострого променевого синдрому.

Приклад 30

У даному прикладі показано, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від *Neisseria meningitidis* загибелі, що викликається після інфікування або *N. meningitidis* серогрупи А, або

Neisseria meningitidis серогрупи В.

Методи

Мишей з нокаутом MASP-2 (миші MASP-2 KO) отримували, як описано в прикладі 1. 10-тижневим мишам MASP-2 KO (n=10) і мишам C57/BL6 дикого типу (ДТ) (n=10) вводили внутрішньоочеревинною (в/ч) ін'єкцією дози $2,6 \times 10^7$ КУО *Neisseria meningitidis* серогрупи А Z2491 в об'ємі 100 мкл. Інфекційну дозу вводили мишам в поєднанні з комплексом залізо-декстран в кінцевій концентрації 400 мг/кг. Вживаність мишей після інфікування контролювали протягом 72-годинного періоду часу.

У окремому експерименті 10-тижневим мишам MASP-2 KO (n=10) і мишам C57/BL6 дикого типу (n=10) вводили в/ч ін'єкцією дози 6×10^6 КУО *Neisseria meningitidis* серогрупи В штаму MC58 в об'ємі 100 мкл. Інфекційну дозу вводили мишам в поєднанні з комплексом залізо-декстран в кінцевій дозі 400 мг/кг. Вживаність мишей після інфікування контролювали протягом 72-годинного періоду часу. Бальний показник нездоров'я також визначав для мишей ДТ і MASP-2 KO протягом 72-годинного періоду часу після інфікування, на основі бальних параметрів нездоров'я, наведених нижче в ТАБЛИЦІ 10, яка заснована на схемі, описаній в публікації Fransen et al. (2010), з невеликими модифікаціями.

Таблиця 10:

БАЛЛЬНІ ПОКАЗНИКИ НЕЗДОРОВ'Я, ПОВ'ЯЗАНІ З КЛІНІЧНИМИ ОЗНАКАМИ У ІНФІКОВАНИХ МИШЕЙ

Ознаки	Бали
Норма	0
Злегка наїжачене хутро	1
Наїжачене хутро, очі, які повільно рухаються і злипаються	2
Наїжачене хутро, в'ялість, заплющені очі	3
Дуже тяжкий стан, немає реакції на стимуляцію	4
Смерть	5

Зразки крові збирали у мишей з часовими інтервалами після інфікування і аналізували для визначення рівня в сироватці (log КУО/мл) *N. meningitidis* з метою підтвердження інфікування і визначення швидкості кліренсу бактерій з сироватки.

Результати

На ФІГУРІ 33 представлений графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після введення інфекційної дози $2,6 \times 10^7$ КУО *N. meningitidis* серогрупи А Z2491. Як показано на ФІГУРІ 33, 100 % мишей MASP-2 KO виживали протягом усього 72-годинного періоду після інфікування. Навпаки, лише 80 % мишей ДТ (p=0,012) були всі ще живі через 24 години після інфікування, і лише 50 % мишей ДТ були всі ще живі через 72 години після інфікування. Ці результати показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis* серогрупи А Z2491.

На ФІГУРІ 34 представлений графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей MASP-2 KO і ДТ після введення інфекційної дози 6×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи В штаму MC58. Як показано на ФІГУРІ 34, 90 % мишей MASP-2 KO виживали протягом усього 72-годинного періоду після інфікування. Навпаки, лише 20 % мишей ДТ (p=0,0022) були всі ще живі через 24 години після інфікування. Ці результати показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від загибелі, що викликається *N. meningitidis* серогрупи В штаму MC58.

На ФІГУРІ 35 наведений графік, що показує log КУО/мл *N. meningitidis* серогрупи В штаму MC58, витягнутих в різні моменти часу із зразків крові, отриманих від мишей MASP-2 KO і ДТ після в/ч інфікування 6×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи В штаму MC58 (n=3 в різні моменти часу для обох груп мишей). Результати представлені у вигляді середніх значень $\pm$ SEM. Як показано на ФІГУРІ 35, у мишей ДТ рівень *N. meningitidis* в крові досягав пікового значення приблизно 6,0 log КУО/мл через 24 години після інфікування і падав до приблизно 4,0 log КУО/мл через 36 годин після інфікування. Навпаки, у мишей MASP-2 KO рівень *N. meningitidis* досягав пікового значення приблизно 4,0 log КУО/мл через 12 годин після інфікування і падав до приблизно 1,0 log КУО/мл через 36 годин після інфікування (символ "*" відповідає p<0,05;

символ "*" відповідає $p=0,0043$). Ці результати показують, що, хоч миші MASP-2 KO були інфіковані такою ж дозою *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, що і миші ДТ, у мишей MASP-2 KO спостерігався підвищений кліренс бактерій з крові порівняно з ДТ.

На ФІГУРІ 36 наведений графік, що показує середній бальний показник нездоров'я для мишей MASP-2 KO і ДТ через 3, 6, 12 і 24 години після інфікування 6×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58. Як показано на ФІГУРІ 36, миші з дефіцитом MASP-2 мали високу стійкість до інфекції, з набагато більш низькими показниками нездоров'я через 6 годин (символ "*" відповідає $p=0,0411$), 12 годин (символ "*" відповідає $p=0,0049$) і 24 години (символ "*" відповідає $p=0,0049$) після інфікування, порівняно з мишами ДТ. Результати на ФІГУРІ 36 представлені у вигляді середніх значень $\pm$ SEM.

Підводячи підсумок, результати в даному прикладі показують, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від *Neisseria meningitidis* загибелі, що викликається після інфікування або *N. meningitidis* серогрупи A, або *N. meningitidis* серогрупи B.

Приклад 31

У даному прикладі показано, що введення анти-MASP-2 антитіла після інфікування *N. meningitidis* приводить до збільшення виживаності мишей, інфікованих *N. meningitidis*.

Передумови/обґрунтування

Як описано в прикладі 10, щурячий білок MASP-2 був використаний для сортування фагово-дисплейної бібліотеки Fab, з якого ідентифікували Fab2 № 11 як функціонально активне антитіло. З Fab2 № 11 були отримані повнорозмірні антитіла щура ізотипу IgG2c і миші ізотипу IgG2a. Повнорозмірне мишаче анти-MASP-2 антитіло ізотипу IgG2a було охарактеризоване відносно фармакодинамічних параметрів (як описано в прикладі 19).

У даному прикладі повнорозмірне мишаче анти-MASP-2 антитіло, отримане з Fab2 № 11, було проаналізовано в мишачій моделі інфекції, що викликається *N. meningitidis*.

Методи

Мишаче повнорозмірне анти-MASP-2 антитіло ізотипу IgG2a, отримане з Fab2 №11, отриманого, як описано вище, тестували в мишачій моделі інфекції, що викликається *N. meningitidis*, таким чином.

Введення мишачих анти-MASP-2 моноклональних антитіл (моАт) після інфікування

Мишам C57/BL6 (Charles River) у віці 9 тижнів вводили інгібуюче мишаче анти-MASP-2 антитіло (1,0 мг/кг) ($n=12$) або контрольне по ізотипу антитіло ($n=10$) через 3 години після в/ч ін'єкції високої дози (4×10^6 КУО) *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58.

Результати

На ФІГУРІ 37 представлений графік Каплана-Мейєра, що показує виживаність, у відсотках, мишей після введення інфекційної дози 4×10^6 КУО *N. meningitidis* серогрупи B штаму MC58, з подальшим введенням через 3 години після інфікування або інгібуючого анти-MASP-2 антитіла (1,0 мг/кг), або контрольного по ізотипу антитіла. Як показано на ФІГУРІ 37, 90 % мишей, що отримували анти-MASP-2 антитіло, виживали протягом усього 72-годинного періоду після інфікування. Навпаки, лише 50 % мишей, що отримували контрольне по ізотипу антитіло, виживали протягом усього 72-годинного періоду після інфікування. Символ "*" відповідає $p=0,0301$, при визначенні шляхом порівняння двох кривих виживаності.

Ці результати показують, що введення анти-MASP-2 антитіла ефективно для лікування і збільшення виживаності у суб'єктів, інфікованих *N. meningitidis*.

Як продемонстровано в цьому документі, використання анти-MASP-2 антитіла в лікуванні суб'єкта, інфікованого *N. meningitidis*, є ефективним при введенні в межах 3 годин після інфікування, і, як очікується, буде ефективним в межах від 24 до 48 годин після інфікування. Менінгококове захворювання (або менінгококемія, або менінгіт) є захворюванням, що вимагає невідкладної медичної допомоги, і терапію, як правило, починають негайно при підозрі на менінгококову інфекцію (тобто, до того, як *N. meningitidis* буде позитивно ідентифікована як етіологічний збудник).

У зв'язку з результатами, отриманими для мишей MASP-2 KO, які описані в прикладі 30, вважається, що введення анти-MASP-2 антитіла до інфікування *N. meningitidis* також було б ефективним для запобігання або ослаблення тяжкості інфекції.

Приклад 32

У даному прикладі показано, що введення анти-MASP-2 антитіла ефективно для лікування інфекції, що викликається *N. meningitidis*, в людській сироватці.

Обґрунтування

Пацієнти із зниженими сироватковими рівнями функціонального MBL мають підвищену схильність до рецидивуючих бактеріальних і грибових інфекцій (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002)). Відомо, що *N. meningitidis* впізнає MBL, і було показано, що

дефіцитна по MBL сироватка не лізує *Neisseria*.

У зв'язку з результатами, описаними в прикладах 30 і 31, проводили серію експериментів для визначення ефективності введення анти-MASP-2 антитіла для лікування інфекції, що викликається *N. meningitidis*, в дефіцитній по компонентах комплементу і контрольній людській сироватці. Експерименти проводили при високій концентрації сироватки (20 %) для збереження шляху комплементу.

Методи

1. Сироваткова бактерицидна активність в різних дефіцитних по компонентах комплементу людських сироватках і в людській сироватці з доданим людським анти-MASP-2 антитілом.

У даному експерименті використовували наступні дефіцитні по компонентах комплементу людські сироватки і контрольні людські сироватки.

Таблиця 11:

ПРОТЕСТОВАНИ ЗРАЗКИ ЛЮДСЬКОЇ СИРОВАТКИ (ЯК ПОКАЗАНО НА ФІГУРІ 38)

Зразок	Тип сироватки
A	Нормальна людська сироватка (НЛС) + людське анти-MASP-2 Ат
B	НЛС+контрольне по ізотипу Ат
C	Людська сироватка MBL -/-
D	НЛС
E	Інактивована нагріванням (ІН) НЛС

Рекомбінантне антитіло проти людського MASP-2 було виділено з комбінаторної бібліотеки антитіл (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)), з використанням рекомбінантного людського MASP-2A як антигенна (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). Був ідентифікований фрагмент scFv проти людського антигена, який ефективно інгібував опосередковувану лектиновим шляхом активацію C4 і C3 в людській плазмі ($IC_{50} \sim 20$ нМ), і перетворений в повнорозмірне людське IgG4 антитіло.

N. meningitidis серогрупи B-MC58 інкубували з різними сироватками, наведеними в ТАБЛИЦІ 11, кожна з них в концентрації 20 %, з доданням, або без додавання, інгібуючого людського анти-MASP-2 антитіла (3 мкг в загальному об'ємі 100 мкл) при 37 °C зі струшуванням. Зразки відбирали в наступних часових точках: через 0, 30, 60 і 90 хвилин, висівали на чашки, а потім підраховували кількість життєздатних клітин. Інактивована нагріванням людська сироватка служила негативним контролем.

Результати

На ФІГУРІ 38 наведений графік, що показує log КУО/мл кількості життєздатних клітин *N. meningitidis* серогрупи B-MC58, витягнутих в різні моменти часу із зразків людських сироваток, наведених в ТАБЛИЦІ 11. У ТАБЛИЦІ 12 наведені результати застосування критерію Ст'юдента до даних на ФІГУРІ 38.

Таблиця 12:

РЕЗУЛЬТАТИ ЗАСТОСУВАННЯ КРИТЕРІЮ СТЬЮДЕНТА ДО ДАНИХ НА ФІГУРІ 38 (ЧАСОВА ТОЧКА 60 ХВИЛИН)

	Середня різниця (Log)	Значуще? $P < 0,05$?	Звідні Р-значення
A проти B	-0,3678	Так	*** (0,0002)
A проти C	-1,1053	Так	*** (p<0,0001)
A проти D	-0,2111	Так	** (0,0012)
C проти D	1,9	Так	*** (p<0,0001)

Як показано на ФІГУРІ 38 і ТАБЛИЦІ 12, залежне від комплементу знищення *N. meningitidis* в людській 20 % сироватці було значно підвищено при додаванні людського анти-MASP-2 інгібуючого антитіла.

2. Залежне від комплементу знищення *N. meningitidis* в 20 % (об./об.) мишачих сироватках,

дефіцитних по MASP-2.

У даному експерименті використовували наступні дефіцитні по компонентах комплементу мишачі сироватки і контрольні мишачі сироватки.

Таблиця 13:

ПРОТЕСТОВАНИ ЗРАЗКИ МИШАЧИХ
СИРОВАТОК (ЯК ПОКАЗАНО НА ФІГУРІ 39)

Зразок	Тип сироватки
A	ДТ
B	MA SP-2/-
C	MBL A/C/-
D	ДТ, інактивована нагріванням (ІН)

5

N. meningitidis серогрупи B-МC58 інкубували з різними дефіцитними по компонентах комплементу мишачими сироватками, кожна з них в концентрації 20 %, при 37 °C зі струшуванням. Зразки відбирали в наступних тимчасових точках: через 0, 15, 30, 60, 90 і 120 хвилин, висівали на чашки, а потім підраховували кількість життєздатних клітин. Інактивована нагріванням людська сироватка служила негативним контролем.

10

Результати

На ФІГУРІ 39 наведений графік, що показує log КУО/мл кількості життєздатних клітин N. meningitidis серогрупи B-МC58, витягнутих в різні моменти часу із зразків мишачих сироваток, наведених в ТАБЛИЦІ 13. Як показано на ФІГУРІ 39, мишача сироватка MASP-2/- має більш високий рівень бактерицидної активності відносно N. meningitidis, ніж мишача сироватка ДТ. Символ "***" відповідає $p=0,0058$, символ "****" відповідає $p=0,001$. У ТАБЛИЦІ 14 наведені результати застосування критерію Стюдента до даних на ФІГУРІ 39.

15

Таблиця 14:

РЕЗУЛЬТАТИ ЗАСТОСУВАННЯ КРИТЕРІЮ СТЬЮДЕНТА ДО ДАНИХ НА ФІГУРІ 39

Порівняння	Часова точка	Середня різниця (LOG)	Значущо? ($p<0,05$)?	Звідні Р-значень
A проти B	60 хв	0,39	так	** (0,0058)
A проти B	90 хв	0,6741	так	*** (0,001)

20

Підводячи підсумок, результати в даному прикладі показують, що сироватка MASP-2/- має більш високий рівень бактерицидної активності відносно N. meningitidis, ніж сироватка ДТ.

Приклад 33

У даному прикладі продемонстрований інгібуючий ефект дефіциту MASP-2 на лізис еритроцитів із зразків крові, отриманих в мишачій моделі пароксизмальної нічної гемоглобінурії (PNH).

25

Передумови/обґрунтування

Пароксизмальна нічна гемоглобінурія (PNH), яка також називається синдромом Маркіафаві-Мікелі, являє собою набуте, потенційно загрозливе життю захворювання крові, що характеризується індукованою комплементом внутрішньосудинною гемолітичною анемією. Характерною особливістю PNH є хронічний внутрішньосудинний гемоліз, який є наслідком підвищеної активації альтернативного шляху комплементу через відсутність регуляторів комплементу CD55 і CD59 на еритроцитах PNH, з подальшою гемоглобінурією і анемією. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010), Risitano, A.M., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011). Анемія при PNH є наслідком руйнування еритроцитів в кровотоці. Симптоми PNH включають червону сечу через появу гемоглобіну в сечі, біль в спині, стомлюваність, задишку і тромбоз. PNH може розвиватися самостійно, її називають "первинною PNH", або в контексті інших захворювань кісткового мозку, таких як апластична анемія, її називають "вторинною PNH". Лікування PNH включає переливання крові від анемії, використання антикоагулянтів від тромбозу і використання моноклонального антитіла екулізумабу (солірис), яке захищає клітини крові від імунного руйнування за рахунок інгібування системи комплементу (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). Екулізумаб (солірис®) являє собою

30

35

40

гуманізоване моноклональне антитіло, направлене на компонент C5 комплексу, яке блокує його розщеплення C5-конвертазами, тим самим запобігаючи освіті C5a і збиранню MAC. Лікування пацієнтів з PNH екулізумабом приводить до зменшення внутрішньосудинного гемолізу, що вимірюють по рівню лактатдегідрогенази (LDH), приводить до стабілізації рівня гемоглобіну і усунення потреби в переливанні крові у приблизно половини пацієнтів (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011)). Хоч у майже всіх пацієнтів, які одержують лікування екулізумабом, відновлюються нормальні або майже нормальні рівні LDH (внаслідок контролю внутрішньосудинного гемолізу), лише приблизно у однієї третини пацієнтів показник гемоглобіну досягає рівня вище за 11 гр/дл, а у інших пацієнтів, які одержують екулізумаб, зберігається анемія середньої або важкої міри (тобто, залежність від переливання крові) в приблизно рівній пропорції (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Як описано в публікації Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011), було показано, що пацієнти з PNH, які одержують екулізумаб, мають фрагменти C3, пов'язані зі значною частиною їх PNH еритроцитів (на відміну від пацієнтів, не одержуючих препарат), це дозволяє зробити висновок, що пов'язані з мембраною фрагменти C3 діють як опсоніни на PNH еритроцитах, приводячи до їх захоплення в ретикулоендотеліальні клітини через специфічні рецептори C3 і подальшого позасудинного гемолізу. Таким чином, необхідні додаткові стратегії лікування, крім використання екулізумабу, для таких пацієнтів, у яких має місце опосередкований фрагментами C3 позасудинний гемоліз, оскільки вони продовжують потребувати переливання еритроцитів.

У даному прикладі описані способи оцінки ефекту дефіцитної по MASP-2- сироватки і сироватки, обробленої інгібуючим MASP-2 засобом, на лізис еритроцитів із зразків крові, отриманих в мишачій моделі PNH, і показана ефективність інгібування MASP-2 в лікуванні суб'єктів, які страждають на PNH, а також наведені свідчення на користь використання інгібіторів MASP-2 для ослаблення ефектів опосередкованого фрагментами C3 позасудинного гемолізу у суб'єктів з PNH, які одержують лікування інгібітором C5, таким як екулізумаб.

Методи

Тваринна модель PNH

Зразки крові отримували від генетично модифікованих мишей з дефіцитом Crry і C3 (Crry/C3^{-/-}) і мишей з дефіцитом CD55/CD59. У цих мишей відсутні відповідні поверхневі регулятори комплексу, внаслідок цього, їх еритроцити схильні спонтанному аутолізу за рахунок комплексу, як людські клітини крові при PNH.)

Для ще більшої сенсифікації таких еритроцитів ці клітини використовували з покриттям і без покриття мананом, а потім тестували на гемоліз в плазмі C56/BL6 ДТ, плазмі MBL-нуль, плазмі MASP-2^{-/-}, людської НЛС, людській плазмі MBL^{-/-} і НЛС, обробленої людським анти-MASP-2 антитілом.

1. Аналіз гемолізу еритроцитів мишей з подвійним дефіцитом Crry/C3 і CD55/CD59 в MASP-2-дефіцитних/виснажених сироватках і контролях

День 1. Приготування мишачих еритроцитів (± покриття мананом)

Матеріали: свіжа мишача кров, BBS/Mg2⁺/Ca²⁺ (4,4 мМ барбітурова кислота, 1,8 мМ натрій барбітал, 145 мМ NaCl, pH7,4, 5 мМ Mg2⁺, 5 мМ Ca²⁺), хлорид хрому, CrCl₃·6H₂O (0,5 мг/мл в BBS/Mg2⁺/Ca²⁺) і манан, 100 мкг/мл в BBS/Mg2⁺/Ca²⁺.

Цільну кров (2 мл) центрифугували протягом 1-2 хв при 2000 x g в охолодженій до 4 °C центрифугі. Плазму і світлий шар кров'яного згустку видаляли аспірацією. Потім зразок промивали три рази шляхом ресуспендування осаду еритроцитів в 2 мл крижаних розчини BBS/желатин/Mg2⁺/Ca²⁺ і повторного центрифугування. Після третього промивання осадок ресуспендували в 4 мл BBS/Mg2⁺/Ca²⁺. 2-мл аліквоту еритроцитів відділяли для використання як контролю без покриття. До 2 мл, що залишився, додавали 2 мл CrCl₃ і 2 мл манану, і зразок інкубували з обережним перемішуванням при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 7,5 мл розчину BBS/желатин/Mg2⁺/Ca²⁺. Зразок центрифугували, як описано вище, ресуспендували в 2 мл розчини BBS/желатин/Mg2⁺/Ca²⁺ і промивали ще два рази, як описано вище, потім зберігали при 4 °C.

День 2. Аналіз гемолізу

Матеріали: BBS/желатин/Mg2⁺/Ca²⁺ (як описано вище), тестовані сироватки, 96-ямкові круглодонні і плоскодонні планшети і спектрофотометр, на якому знімають показання з 96-ямкових планшетів при 410-414 нм.

Спочатку визначали концентрацію еритроцитів, доводили кількість клітин до 109/мл і зберігали при цій концентрації. Перед використанням розбавляли аналітичним буфером до 108/мл, і використовували по 100 мкл на ямку. Гемоліз вимірювали при 410-414 нм (при цьому досягається більша чутливість, ніж при 541 нм). Розведення тестованих сироваток готували в

крижаному розчині BBS/желатин/Mg²⁺/Ca²⁺. 100 мкл сироватки в кожному розведенні переносили піпеткою в круглодонний планшет (дивись план планшета). Додавали 100 мкл відповідним чином розведеного препарату еритроцитів (тобто, 108/мл) (дивись план планшета), інкубували при 37 °C протягом приблизно 1 години і контролювали на лізис. (На даному етапі планшети можна фотографувати). Потім планшет центрифугували при максимальній швидкості протягом 5 хвилин. Відбирали 100 мкл рідких фази, переносили в плоскодонні планшети і реєстрували OD при 410-414 нм. Осадки еритроцитів зберігали (згодом їх можна лізувати водою, щоб отримати зворотний результат).

Експеримент № 1

Отримували свіжу кров від мишей з подвійним дефіцитом CD55/CD59 і кров від мишей з подвійним дефіцитом Crry/C3, і готували препарат еритроцитів відповідно до протоколу, детально описаного вище. Клітини розділяли, половину клітин покривали мананом, і іншу половину залишали без обробки, доводячи кінцеву концентрацію до 1×10⁸ в мл, з них 100 мкл використовували в аналізі гемолізу, який проводили, як описано вище.

Результати експерименту № 1: Лектиновий шлях залучений в лізис еритроцитів в тваринній моделі PNH

У початковому експерименті було визначено, що не покриті еритроцити мишей ДТ не лізувались в жодній з мишачих сироваток. Також було визначено, що покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- лізувались повільно (більш 3 годин при 37 градусах) в сироватці мишей ДТ, однак вони не лізувались в сироватці MBL-нуль. (Дані не представлені).

Було визначено, що покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- швидко лізувались в людській сироватці, але не в інактивованій нагріванням НЛС. Важливо зазначити, що покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- лізувались в НЛС, розведеної до 1/640 (тобто, лізис при всьому розведенні 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 і 1/640). (Дані не представлені). При даному розведенні альтернативний шлях не працює (функціональна активність АП значно знижується при концентрації сироватки нижче за 8 %).

Висновки з експерименту № 1

Покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- дуже добре лізуються в сильно розведених людській сироватці з MBL, але не в такій сироватці без MBL. Ефективний лізис при кожній протестованій концентрації сироватки вказує на те, що альтернативний шлях не бере участь, або не потрібен для такого лізису. Нездатність мишачої сироватки, і людської сироватки, з дефіцитом MBL до лізису покритих мананом еритроцитів мишей Crry-/- вказує на те, що класичний шлях також не має відношення до лізису, що спостерігається. Оскільки необхідні молекули впізнавання лектинового шляху (тобто, MBL), цей лізис опосередкований лектиновим шляхом.

Експеримент № 2

Отримували свіжу кров від мишей з подвійним дефіцитом Crry/C3 і CD55/CD59, і покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- аналізували в аналізі гемолізу, як описано вище, в присутності наступних людських сироваток: MBL-нуль; ДТ; НЛС із заздалегідь доданим людським анти-MASP-2 антитілом і інактивована нагріванням НЛС як контроль.

Результати експерименту № 2: Інгібітори MASP-2 запобігають лізис еритроцитів в тваринній моделі PNH

Покриті мананом еритроцити мишей Crry-/- інкубували з НЛС в розведенні до 1/640 (тобто, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 і 1/640), людською сироваткою MBL-/-, НЛС із заздалегідь доданим анти-MASP-2 мАт і інактивованої нагріванням НЛС як контроль.

У аналізі ELISA планшет для мікротитрування центрифугували, і не лізовані еритроцити збирали на дні круглодонного планшета. Супернатант з кожної ямки збирали, і кількість гемоглобіну, вивільненого з лізованих еритроцитів, вимірювала на основі OD при 415 нм в ELISA рідері.

У контрольній інактивованої нагріванням НЛС (негативний контроль), як і очікувалося, лізис був відсутній. Людська сироватка MBL-/- лізувала покриті мананом еритроцити мишей при розведенні 1/8 і 1/16. НЛС із заздалегідь доданим анти-MASP-2-антитілом лізувала покриті мананом еритроцити мишей при розведенні 1/8 і 1/16, в той час як людська сироватка ДТ лізувала покриті мананом еритроцити мишей при розведенні до 1/32.

На ФІГУРІ 40 наведений графік, що показує гемоліз (вимірюваний на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих еритроцитів мишей (Crry/C3-/-) в супернатант фотометричним методом) покритих мананом еритроцитів мишей людською сироваткою в діапазоні сироваткових концентрацій, з використанням інактивованої нагріванням (IH) НЛС, MBL-/-, НЛС із заздалегідь доданим анти-MASP-2 антитілом і контрольною НЛС.).

Результати, представлені на ФІГУРІ 40, показують, що інгібування MASP-2 анти-MASP-2

антитілом приводить до значного зміщення CH_{50} і інгібує опосередковуваний комплементом лізис сенсibilізованих еритроцитів з недостатнім захистом від аутологічної активації комплекменту.

Експеримент № 3

- 5 Отримували свіжу кров від мишей з подвійним дефіцитом $Crry/C3$ і $CD55/CD59$, і не покриті еритроцити мишей $Crry/-$ аналізували в аналізі гемолізу, як описано вище, в присутності наступних сироваток: MBL-/-; сироватка ДТ; НЛС із заздалегідь доданим людським анти-MASP-2 антитілом і інактивована нагріванням НЛС як контроль.

Результати

- 10 На ФІГУРІ 41 наведений графік, що показує гемоліз (виміряний на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих еритроцитів мишей ДТ в супернатант фотометричним методом) не покритих мананом еритроцитів мишей людською сироваткою в діапазоні сироваткових концентрацій, з використанням інактивованої нагріванням (ІН) НЛС, MBL-/-, НЛС із заздалегідь доданим анти-MASP-2 антитілом і контрольною НЛС. Як показано на ФІГУРІ 41, інгібування
- 15 MASP-2 приводить до інгібування опосередкованого комплекментом лізису не сенсibilізованих еритроцитів мишей ДТ.

- 20 На ФІГУРІ 42 наведений графік, що показує гемоліз (виміряний на основі вивільнення гемоглобіну з лізованих еритроцитів мишей ($CD55/59/-$) в супернатант фотометричним методом) не покритих мананом еритроцитів мишей людською сироваткою в діапазоні сироваткових концентрацій, з використанням інактивованої нагріванням (ІН) НЛС, MBL-/-, НЛС із заздалегідь доданим анти-MASP-2 антитілом і контрольною НЛС.).

Таблиця 12:

ЗНАЧЕННЯ CH_{50} , ВИРАЖЕНІ У ВИГЛЯДІ СИРОВАТКОВИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

Сироватка	ДТ	$CD55/59/-$
Інактивована нагріванням НЛС	Без лізису	Без лізису
MBL АО/XX донор (дефіцит MBL)	7,2 %	2,1 %
НЛС+анти-MASP-2 антитіло	5,4 %	1,5 %
НЛС	3,1 %	0,73 %

- 25 Примітка: " CH_{50} " являє собою точку, в якій опосередкований комплекментом гемоліз досягає 50 %.

- 30 Підводячи підсумок, результати в даному прикладі показують, що інгібування MASP-2 приводить до інгібування опосередкованого комплекментом лізиса сенсibilізованих і не сенсibilізованих еритроцитів з недостатнім захистом від аутологічної активації комплекменту. Таким чином, інгібітори MASP-2 можуть бути використані для лікування суб'єктів, які страждають на PNH, і також можуть бути використані для полегшення (тобто, інгібування, запобігання або зменшенню ступеню тяжкості) позасудинного гемолізу у пацієнтів з PNH, які одержують лікування інгібітором $C5$, таким як екулізумаб (солірис®).

Приклад 34

- 35 У даному прикладі описане дослідження, що є продовженням дослідження, описаного вище в прикладі 29, в якому були отримані додаткові доказу того, що інгібітор MASP-2, такий як анти-MASP-2 антитіло, ефективний для лікування наслідків опромінення і/або для лікування, полегшення або запобігання гострому променевому синдрому.

Обґрунтування

- 40 У початковому дослідженні, описаному в прикладі 29, було показано, що введення мишам анти-MASP-2 антитіла перед опроміненням приводило до збільшення виживаності опромінених мишей, порівняно з тими, що отримували розчинник опроміненими контрольними тваринами, при обох рівнях опромінення, 6,5 Гр і 7,0 Гр. У прикладі 29 також було продемонстровано, що при рівні опромінення 6,5 Гр, введення після опромінення анти-MASP-2 антитіла приводило до помірного збільшення виживаності порівняно з тими, що отримували розчинник опроміненими
- 45 контрольними тваринами. У даному прикладі описане друге дослідження з опроміненням, яке проводили для підтвердження результатів першого дослідження.

Методи

Дизайн дослідження А:

- 50 Мишей лінії Swiss Webster ($n=50$) піддавали впливу іонізуючого випромінювання (8,0 Гр). Оцінювали ефект на смертність терапії анти-MASP-2 антитілом (мАт Н6 5 мг/кг), введеним за 18 годин до, і через 2 години після, опромінення, а потім щотижня.

Результати дослідження А:

Як показано на ФІГУРІ 43, було встановлено, що введення анти-MASP-2 антитіла мАт Н6 приводило до збільшення виживаності мишей, підданих опроміненню 8,0 Гр, з відкоректованою середньою виживаністю, збільшеною з 4 до 6 днів порівняно з мишами, що отримували контрольний розчинник, і із зменшенням смертності на 12 % порівняно з мишами, що отримували контрольний розчинник (логарифмічний ранговий критерій, $p=0,040$).

Дизайн дослідження В:

Мишей лінії Swiss Webster ($n=50$) піддавали впливу іонізуючого випромінювання (8,0 Гр) в наступних групах (I: розчинник) контрольний сольовий розчин; (II: низька доза) анти-MASP-2 антитіло мАт Н6 (5 мг/кг) вводили за 18 годин до опромінення і через 2 години після опромінення; (III: висока доза) мАт Н6 (10 мг/кг) вводили за 18 годин до опромінення і через 2 години після опромінення; і (IV: висока доза після опромінення) мАт Н6 (10 мг/кг) вводили тільки через 2 години після опромінення.

Результати дослідження В:

Введення анти-MASP-2 антитіла до і після опромінення приводило до збільшення середньої виживаності з 4 до 5 днів, порівняно з тваринами, що отримували контрольний розчинник. Смертність у анти-MASP-2, що отримували антитіло мишей була знижена на 6-12 % порівняно з мишами, що отримували контрольний розчинник. Також потрібно зазначити, що які-небудь істотні шкідливі ефекти лікування був відсутній (дані не представлені).

Підводячи підсумок, результати, описані в даному прикладі, узгодяться з результатами, описаними в прикладі 29, і також показують, що анти-MASP-2 антитіла ефективні в лікуванні суб'єкта-ссавця, що має ризик розвитку, або страждаючого від, руйнівних ефектів гострого променевого синдрому.

Приклад 35

У даному дослідженні вивчали ефект дефіциту MASP-2 в мишачій моделі LPS (ліпополісахарид)-індукованого тромбозу.

Обґрунтування

Гемолітичний уремичний синдром (HUS), що є наслідком інфекції, що викликається продукуючою шига-токсин *E. coli*, є основною причиною гострої ниркової недостатності у дітей. У даному прикладі модель Шварцмана LPS-індукованого тромбозу (мікрovasкулярної коагуляції) створювали на мишах MASP-2-/- (KO) для визначення того, чи буде інгібування MASP-2 ефективним для інгібування або запобігання утворенню внутрішньосудинних тромбів.

Методи

Мишей MASP-2-/- ($n=9$) і ДТ ($n=10$) аналізували в моделі Шварцмана LPS-індукованого тромбозу (мікрovasкулярної коагуляції). Мишам вводили LPS *Serratia* і контролювали утворення тромбів з плином часу. Проводили порівняння частоти випадків мікротромбів і LPS-індукованої мікрovasкулярної коагуляції.

Результати

Примітно, що у жодної з протестованих мишей MASP-2-/- (9/9) не утворилися внутрішньосудинні тромби після введення LPS *Serratia*. Навпаки, мікротромби були виявлені у 7 з 10 мишей ДТ, протестованих паралельно ($p=0,0031$, точний критерій Фішера). Як показано на ФІГУРІ 44, був виміряний час до початку мікрovasкулярної оклюзії після введення LPS у мишей MASP-2-/- і ДТ, і показана процентна частка мишей ДТ з утворенням тромбів, визначеним протягом 60 хвилин, при цьому утворення тромбів було виявлене вже через приблизно 15 хвилин. Аж до 80 % мишей ДТ мали тромби, що утворилися через 60 хвилин. Навпаки, як показано на ФІГУРІ 44, у жодної з мишей MASP-2-/- не були утворені тромби через 60 хвилин (логарифмічний ранговий критерій: $p=0,0005$).

Ці результати показують, що інгібування MASP-2 захищає від утворення внутрішньосудинних тромбів в моделі HUS.

Приклад 36

У даному прикладі описаний ефект анти-MASP-2 антитіл в мишачій моделі HUS при спільному внутрішньочеревинному введенні ін'єкцією очищеного шига-токсину 2 (STX2) плюс LPS.

Передумови

Мишача модель HUS була розроблена з використанням спільного внутрішньочеревинного введення ін'єкцією очищеного шига-токсину 2 (STX2) плюс LPS. Біохімічний і мікоматричний аналіз нирок мишей показав, що результат введення STX2 плюс LPS відрізняється від ефектів введення кожного засобу окремо. Аналіз крові і сироватки цих мишей показав наявність нейтрофілії, тромбоцитопенії, гемолізу еритроцитів і підвищених сироваткових рівнів креатиніну і азоту сечовини крові. Крім того, гістологічний і електронно-мікроскопічний аналіз нирок мишей

показав відкладення фібрину в клубочках, застій еритроцитів, утворення мікротромбів і зміни ультраструктури клубочків. Було встановлено, що дана модель HUS на мишах C57BL/6 має всі клінічні симптоми патології HUS людини, включаючи тромбоцитопенію, гемолітичну анемію і ниркову недостатність, які визначають захворювання людини. (J. Immunol 187(1):172-80 (2011)).

5 Методи

Самиць мишей C57BL/6 з масою тіла 18-20 г купували у компанії Charles River Laboratories і розділяли на 2 групи (по 5 мишей в кожній групі). Мишам в одній групі заздалегідь вводили внутрішньоочеревинною (в/ч) ін'єкцією рекомбінантне анти-MASP-2 антитіло мАт М11 (100 мкг на мишу; що відповідало кінцевій дозі 5 мг/кг маси тіла), розведене в загальному об'ємі 150 мкл сольового розчину. Тварини в контрольній групі отримували сольовий розчин без антитіла. Через шість годин після в/ч ін'єкції анти-MASP-2 антитіла мАт М11 всі миші отримували комбіновану в/ч ін'єкцію сублетальної дози (3 мкг/тварина; що відповідало 150 мкг/кг маси тіла) LPS з *Serratia marcescens* (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) і дозу 4,5 нг/тварина (що відповідало 225 нг/кг) STX2 (двократна доза LD50) в загальному об'ємі 150 мкл. Ін'єкцію сольового розчину використовували як контроль.

Вживаність мишей контролювали кожні 6 годин після дозування. Мишей умертвляли, як тільки вони досягали летаргічної стадії патології HUS. Через 36 часів всіх мишей умертвляли і витягували обидві нирки для аналізу методами імуногістохімії і скануючої електронної мікроскопії. Зразки крові збирали в кінці експерименту шляхом проколу серця. Отримували сироватку і зберігали її замороженою при -80 °C для вимірювання рівнів BUN і сироваткового креатиніну як в експериментальній, так і в контрольній, групах.

Імуногістохімія

Одну третину кожної мишачої нирки фіксували в 4 % параформальдегіді протягом 24 год., обробляли і заливали парафіном. Отримували зрізи товщиною три мікрони і вміщували на заряджене предметне скло для подальшого фарбування барвником H & E.

Електронна мікроскопія

Середню секцію нирок нарізували на блоки розміром приблизно 1-2 мм³ і фіксували протягом ночі при 4 °C в 2,5 % розчині глутаральдегіду в 1x PBS. Потім фіксована тканина була оброблена в Корпусі електронної мікроскопії Університету Лестера.

Кріостатні зрізи

Іншу третину нирок нарізували на блоки розміром приблизно 1-2 мм³, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80 °C для отримання кріостатних зрізів і аналізу мРНК.

Результати

На ФІГУРІ 45 наведений графік, що показує виживаність, у відсотках, що отримували сольовий розчин контрольних мишей (n=5) і анти-MASP-2, що отримували антитіло мишей (n=5) в моделі, індукованій STX/LPS, з плином часу (години). Примітно, що, як показано на ФІГУРІ 45, всі з контрольних мишей загинули через 42 години. У різкому контрасті, 100 % анти-MASP-2, що отримували антитіло мишей вижили протягом всього експерименту. Відповідно до результатів, представлених на ФІГУРІ 45, було виявлено, що всі миші, що не отримували препарат, які або загинули, або були умертвлені з ознаками тяжкого захворювання, мали значні пошкодження клубочків, при цьому клубочки всіх анти-MASP-2 мишей, що отримували виглядали нормальними (дані не представлені). Ці результати показують, що інгібітори MASP-2, такі як анти-MASP-2 антитіла, можуть бути використані для лікування суб'єктів, страждаючих від, або що мають ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (TMA), такої як гемолітичний уремичний синдром (HUS), атиповий HUS (aHUS) або тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП).

Приклад 37

У даному прикладі описаний ефект дефіциту MASP-2 і інгібування MASP-2 при індукованому у мишей FITC-декстраном/світло пошкодженні ендотеліальних клітин, що є моделлю тромбозу.

Передумови/обґрунтування

Як показано в прикладах 35 і 36, дефіцит MASP-2 (MASP-2 KO) і інгібування MASP-2 (шляхом введення інгібуючого анти-MASP-2 антитіла) захищає мишей в моделі типового HUS, в той час як у всіх контрольних мишей, підданих впливу STX і LPS, розвивався важкий HUS, і вони знаходилися в передсмертному стані або гинули в межах 48 годин. Наприклад, як показано на ФІГУРІ 54, всі миші, що отримували анти-MASP-2 інгібуюче антитіло, а потім піддані впливу STX і LPS, виживали (точний критерій Фішера p<0,01; N=5). Таким чином, введення анти-MASP-2 захищає мишей в даній моделі HUS.

Проводили наступні експерименти для аналізу ефекту дефіциту MASP-2 і інгібування MASP-2 при індукованому флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)-декстраном пошкодженні ендотеліальних клітин, що є моделлю тромботичної мікроангіопатії (TMA), для додаткової демонстрації користі інгібіторів MASP-2 в лікуванні HUS, aHUS, ТТП, а також TMA з іншою етіологією.

Методи

Прижиттєва мікроскопія

Мишей готували для прижиттєвої мікроскопії, як описано в публікації Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 2011. Коротко, мишей анестезували внутрішньоочеревинною (в/ч) ін'єкцією кетаміну (125 мг/кг маси тіла, кетанест, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germany) і ксилазину (12,5 мг/кг маси тіла; ромпан, Bayer, Leverkusen, Germany) і вміщували на теплу підкладку для підтримки температури тіла на рівні 37 °C. Прижиттєву мікроскопію проводили за допомогою вертикального мікроскопа (Leica, Wetzlar, Germany), використовуючи імерсійний об'єктив з сольовим розчином (SW 40/0,75 числова апертура, Zeiss, Jena, Germany). Для полегшення дихання мишей інтубували з використанням трубки PE 90 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA). Ліву сонну артерію канюлювали трубкою PE10 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA) для відбору крові і системного введення моноклонального антитіла (мАт).

Підготовка м'яза, який підтримує яєчко

Хірургічну підготовку м'яза, який підтримує яєчко, для прижиттєвої мікроскопії виконували, як описано в публікації Sperandio et al., Blood, 97:3812-3819, 2001. Коротко, мошонку відкривали і забезпечували рухливість м'яза, який підтримує яєчко. Після подовжнього розрізу і розміщення м'яза на покривному склі додаток яєчка і яєчко зсували і притискували в сторону, забезпечуючи повний доступ для мікроскопа до мікроеваскулярної системи м'яза, підтримуючої яєчко. Проводили запис венул м'яза, який підтримує яєчко, з використанням камери CCD (CF8/1; Kappa, Gleichen, Germany) на записуючому пристрої Panasonic S-VHS. М'яз, підтримуючий яєчко, обливали бікарбонатним буфером з сольовим розчином з контрольованою температурою (35 °C), як раніше описано в публікації Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 2011.

Модель пошкодження, що викликається FITC-декстраном при збудженні світлом

Що контролюється, залежне від дози світлового випромінювання пошкодження судинного ендотелію венул і артеріол в м'язі, підтримуючому яєчко, індукували за рахунок збудження світлом фототоксичного (FITC)-декстрану (каталожний № FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.). Ця процедура запускає локалізований тромбоз. 60 мкл 10 % мас./об. розчину FITC-декстрану як фототоксичного реагент вводили ін'єкцією через ліву сонну артерію і дозволяли однорідно розподілятися за системою кровообігу протягом 10 хвилин. Після вибору добре перфузованої венули світло галогенової лампи з інтенсивністю від низької до середньої (800-1500) фокусували на цікавлячій судині, індукуючи флуоресценцію FITC-декстрану і слабку або помірну фототоксичність для поверхні ендотелію з метою стимулювання тромбозу, чином, що контролюється, що відтворюється. Необхідну фототоксичну інтенсивність світла для збудження FITC-декстрану створювали з використанням галогенової лампи (12 В, 100 Вт, Zeiss, Oberkochen, Germany). Для фототоксичності, виникаючої внаслідок індукованого світлом збудження флуорохрому, необхідна порогова інтенсивність світла і/або тривалість освітлення, і фототоксичність буває викликана або прямим нагріванням ендотеліальної поверхні, або утворенням активних кисневих радикалів, як описано в публікації Steinbauer et al., Langenbecks Arch Surg 385:290-298, 2000.

Інтенсивність світла, що застосовується до кожної судини, вимірювали для регулювання за допомогою діодного детектора з корекцією довжини хвилі для вимірювань малої потужності (Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA). Автономний аналіз відео-сканів проводили з використанням комп'ютерної системи аналізу мікроциркуляції (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg), і швидкість еритроцитів вимірювали, як описано в публікації Zeintl et al., Int J Microcirc Clin Exp, 8(3):293-302, 2000.

Застосування моноклонального інгібуючого антитіла проти людського MASP-2 (мАт H6) і контрольного розчинника перед індукцією тромбозу

Використовуючи "сліпий" дизайн дослідження, самцям-однопоносникам мишей C57BL/6 ДТ у віці 9 тижнів вводили в/ч ін'єкціями або рекомбінантне моноклональне антитіло проти людського MASP-2 (мАт H6), інгібітор функціональної активності MASP-2 (в кінцевій дозі 10 мг/кг маси тіла), або така ж кількість контрольного по ізотипу антитіла (без інгібуючої MASP-2 активності) за 16 годин до фототоксичної індукції тромбозу в м'язі, підтримуючому яєчко, моделі для прижиттєвої мікроскопії. За годину до індукції тромбозу вводили другу дозу або мАт H6, або контрольного антитіла. Мишей з нокаутом (KO) MASP-2 також оцінювали в даній моделі.

мАт H6 (отримане до рекомбінантного людського MASP-2) є сильним інгібітором функціональної активності людського MASP-2, яке перехресно реагує, зв'язує і інгібує мишачий MASP-2, але з більш низької афінністю внаслідок його специфічності для біологічного виду (дані не представлені). Для компенсації більш низької афінності мАт H6 для мишачого MASP-2, мАт H6 вводили в більш високій дозі (10 мг/кг маси тіла) з метою подолання відмінностей у видовий

специфічності і меншій афінності відносно мишачого MASP-2, і забезпечення ефективного блокування функціональної активності мишачого MASP-2 в умовах *in vivo*.

У даному "сліпому" дослідженні реєстрували час, необхідний для повної оклюзії кожної окремої протестованої венули (критеріями вибору були порівнянні діаметри і швидкості кровотоку).

Процентну частку мишей з оклюзією мікросудин, час до початку і час до повної оклюзії оцінювали протягом 60-хвилинного періоду спостереження, використовуючи відеозапис процедури прижиттєвої мікроскопії.

Результати

На ФІГУРІ 46 наведений графік, що показує, залежно від часу після індукції пошкодження, процентну частку мишей з оклюзією мікросудин в моделі з УФ збудженням FITC/декстрану після введення ізотипічного контролю або антитіла проти людського MASP-2 мАт Н6 (10 мг/кг) за 16 годин і 1 година до ін'єкції FITC/декстрану. Як показано на ФІГУРІ 46, у 85 % мишей дикого типу, що отримували контрольне по ізотипу антитіло, відбувалася оклюзія протягом 30 хвилин або менше, в той час як лише у 19 % мишей дикого типу, що заздалегідь отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6), відбувалася оклюзія протягом цього періоду часу, і початок оклюзії був відстрочений у мишей, у яких в результаті відбувалася оклюзія, в групі отримання антитіла проти людського MASP-2. Також було зазначено, що у трьох мишей, що отримували анти-MASP-2 мАт Н6, оклюзія не відбувалася протягом усього 60-хвилинного періоду спостереження (тобто, вони були захищені від тромботичної оклюзії).

На ФІГУРІ 47 наведений графік, що показує час до оклюзії, в хвилинах, для мишей, що отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6) і контрольне по ізотипу антитіло. Дані представлені у вигляді діаграми розсіяння зі середніми значеннями (горизонтальні межі) і планками стандартних погіршеностей (вертикальні межі). На даній фігурі показаний час до оклюзії у мишей, у яких оклюзію можна було спостерігати. Таким чином, три анти-MASP-2, що отримували антитіло миші, у яких не відбувалася оклюзія протягом 60-хвилинного періоду спостереження, не були включені в даний аналіз (у всіх контрольних мишей відбувалася оклюзія). Для статистичного аналізу використовували непарний критерій Стюдента; при цьому символ "*" відповідає $p=0,0129$. Як показано на ФІГУРІ 47, у чотирьох анти-MASP-2, що отримували антитіло (мАт Н6) мишей, у яких відбувалася оклюзія, введення анти-MASP-2 антитіла приводило до значного збільшення періоду часу до оклюзії венул в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин при низькій інтенсивності світла (800-1500), порівняно з мишами, що отримували контрольне по ізотипу антитіло. Середній час до повної оклюзії в групі ізотипічного контролю становив 19,75 хвилин, в той час як середній час до повної оклюзії в групі тварин, що отримували анти-MASP-2 антитіло, становило 32,5 хвилин.

На ФІГУРІ 48 наведений графік, що показує час до оклюзії, в хвилинах, для мишей дикого типу, мишей MASP-2 KO і мишей дикого типу, що заздалегідь отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6), введене в/ч в дозі 10 мг/кг за 16 годин до, а потім знову введене в/в за 1 годину до, індукції тромбозу в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин при низькій інтенсивності світла (800-1500). Лише дані для тварин, у яких відбувалася оклюзія, включені на ФІГУРІ 48; $n=2$ для мишей дикого типу, що отримували контрольне по ізотипу антитіло; $n=2$ для MASP-2 KO; і $n=4$ для мишей дикого типу, що отримували антитіло проти людського MASP-2 (мАт Н6). Символ "*" відповідає $p<0,01$. Як показано на ФІГУРІ 48, дефіцит MASP-2 і інгібування MASP-2 (мАт Н6 в дозі 10 мг/кг) приводили до збільшення часу до венозної оклюзії в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин при низькій інтенсивності світла (800-1500).

Висновки

Результати в даному прикладі додатково показують, що інгібуючий MASP-2 засіб, який блокує лектиновий шлях (наприклад, антитіла, які блокують функцію MASP-2), інгібує мікроваскулярну коагуляцію і тромбоз, характерні ознаки багатьох мікроангіопатичних захворювань, в мишачій моделі TMA. Таким чином, очікується, що введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло, буде ефективним методом лікування пацієнтів, які страждають на HUS, aHUS, ТТП або інших мікроангіопатичних захворювань, і забезпечить захист від мікроваскулярної коагуляції і тромбозу.

Приклад 38

У даному прикладі описане дослідження, що демонструє, що людське інгібуюче MASP-2 антитіло (мАт Н6) не впливає на функцію тромбоцитів в багатій тромбоцитами людській плазмі.

Передумови/обґрунтування

Як описано в прикладі 37, було показано, що інгібування MASP-2 людським інгібуючим MASP-2 антитілом (мАт Н6), приводить до збільшення часу до венозної оклюзії в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин. Проводили наступний експеримент для визначення того, чи впливає інгібуюче MASP-2 антитіло (мАт Н6) на функцію тромбоцитів.

Методи

Тестували ефект людського анти-MASP-2 антитіла мАт Н6 на індуковану АДФ агрегацію тромбоцитів таким чином. Людське анти-MASP-2 мАт Н6 в концентрації або 1 мкг/мл, або 0,1 мкг/мл, додавали в кількості 40 мкл розчину до 360 мкл свіжоприготованої багатоклітинної тромбоцитами людської плазми. Контрольне по ізотипу антитіло використовували як негативний контроль. Після додавання антитіла до плазми індукували активацію тромбоцитів шляхом додавання АДФ до кінцевої концентрації 2 мкМ. Аналіз починали перемішуванням розчинів невеликим магнітом в 1-мл кюветі. Агрегацію тромбоцитів вимірювали на двоканальному приладі для вимірювання агрегації тромбоцитів Chrono-log моделі 700 Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer.

Результати

Агрегацію, у відсотках, в розчинах вимірювали протягом п'яти хвилин. Результати наведені нижче в ТАБЛИЦІ 13.

Таблиця 13:

АГРЕГАЦІЯ ТРОМБОЦИТІВ ПРОТЯГОМ П'ЯТИ ХВИЛИН

Антитіло	Амплітуда (агрегація, %)	часу
Анти-MASP-2 антитіло (мАт Н6) (1 мкг/мл)	46 %	59
Контрольне по ізотипу антитіло (1 мкг/мл)	49 %	64
Анти-MASP-2 антитіло (мАт Н6) (0,1 мкг/мл)	52 %	63
Контрольне по ізотипу антитіло (0,1 мкг/мл)	46 %	59

Як показано вище в ТАБЛИЦІ 13, була відсутня істотна різниця між агрегацією індукованих АДФ тромбоцитів, оброблених контрольним антитілом або анти-MASP-2 антитілом мАт Н6. Ці результати показують, що людське анти-MASP-2 антитіло (мАт Н6) не впливає на функцію тромбоцитів. Таким чином, результати, описані в прикладі 37, які показують, що інгібування MASP-2 людським інгібуючим MASP-2 антитілом (мАт Н6) приводило до збільшення часу до венозної оклюзії в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин, не були наслідком ефекту мАт Н6 на функцію тромбоцитів. Таким чином, інгібування MASP-2 запобігає тромбозу, не впливаючи прямого чином на функцію тромбоцитів, це свідчить про те, що механізм терапевтичної дії відрізняється від протитромботичних засобів, що є.

Приклад 39

У даному прикладі описаний ефект інгібування MASP-2 на утворення тромбів і оклюзію судин в мишачій моделі ТМА.

Передумови/обґрунтування

Лектиновий шлях грає основну роль в активації системи комплементу в умовах стресу і пошкодження ендотеліальних клітин. Ця активація швидко посилюється в альтернативній шляху, яка порушена у багатьох пацієнтів, що мають аHUS. Внаслідок цього очікується, що запобігання активації MASP-2 і лектинового шляху буде зупиняти послідовність ферментативних реакцій, що приводить до утворення мембраноатакуючого комплексу, активації тромбоцитів і рекрутингу лейкоцитів. Цей ефект обмежує пошкодження тканин.

Крім того, MASP-2 має активність, подібну активності фактора Ха, і розщеплює протромбін, з утворенням тромбіну. Ця регульована MASP-2 активація системи коагуляції може порушувати гемостаз і приводити до патології ТМА. Таким чином, очікується, що інгібування MASP-2 за допомогою інгібітора MASP-2, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло, яке блокує активацію систем комплементу і коагуляції, буде поліпшувати вихід при аHUS і інших аналогічних станах ТМА.

Як описано в прикладі 37, було продемонстровано, що інгібування MASP-2 людським інгібуючим MASP-2 антитілом (мАт Н6) збільшувало час до венозної оклюзії в моделі тромбозу, що являє собою індуковане FITC-декстраном/світло пошкодження ендотеліальних клітин. У даній моделі ТМА мишей сенсibilізували шляхом в/в ін'єкції FITC-декстрану, з подальшою локалізованою фотоактивацією FITC-декстрану в мікроваскулярній мережі м'яза, який підтримує

яєчко (Thorlacius H et al., Eur J Clin. Invest 30(9):804-10, 2000; Agero et al., Toxicon 50(5):698-706, 2007).

Проводили наступний експеримент для визначення того, чи має інгібуюче MASP-2 антитіло (мАт Н6) залежний від дози ефект на утворення тромбів і оклюзію судин в мишачій моделі ТМА.

Методи

Локалізований тромбоз індукували шляхом фотоактивації міченого флуоресцеїн ізотіоціанатом декстрану (FITC-декстран) в мікроваскулярній мережі м'яза, який підтримує яєчко, у мишей C57Bl/6, і використовували прижиттєву мікроскопію для визначення часу початку утворення тромбів і оклюзії судин, використовуючи способи, описані в прикладі 37, з наступними модифікаціями. Групам мишей вводили мАт Н6 (2 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) або контрольне по ізотипу антитіло (20 мг/кг) внутрішньовенно (в/в) ін'єкцією за одну годину до індукції ТМА. Реєстрували час до початку утворення тромбів і час до повної оклюзії судин. Подальший аналіз відеозображень прижиттєвої мікроскопії, записаних протягом 30-60 хвилин, використовували для оцінки розміру судин, швидкості кровотоку, інтенсивності світла, швидкості на початку утворення тромбів як еквівалента адгезії тромбоцитів, час до початку утворення тромбів, швидкість повної оклюзії судин і час до повної оклюзії судин. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SigmaPlot v 12.0.

Результати

Ініціація утворення тромбів

На ФІГУРІ 49 представлений графік Каплана-Мейєра, що показує процентну частку мишей з тромбами, залежно від часу, в моделі індукованої FITC-декстраном тромботичної мікроангіопатії у мишей, що отримували зростаючі дози людського інгібуючого MASP-2 антитіла (мАт Н6 в дозах 2 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) або контрольне по ізотипу антитіло. Як показано на ФІГУРІ 49, початок утворення тромбів був відстрочений у мишей, що отримували мАт Н6 залежним від дози чином порівняно з мишами.

На ФІГУРІ 50 наведений графік, що показує середній час (хвилини) до початку утворення тромбів залежно від дози мАт Н6 (* $p < 0,01$ порівняно з контролем). Як показано на ФІГУРІ 50, середній час до початку утворення тромбів зростало із збільшенням дози мАт Н6 від 6,8 хвилин в контрольній групі до 17,7 хвилин в групі тварин, що отримували 20 мг/кг мАт Н6 ($p < 0,01$). Експериментальні дані, що Служать основою і результати статистичного аналізу наведені в ТАБЛИЦЯХ 14 і 15.

Час до початку утворення тромбів у окремих мишей, зареєстрований на основі оцінки відеозапису, наведений нижче в ТАБЛИЦІ 14.

Таблиця 14:

ЧАС ДО ПОЧАТКУ УТВОРЕННЯ ТРОМБІВ ПІСЛЯ ІНДУКОВАНОГО СВІТЛОМ/БАРВНИКОМ ПОШКОДЖЕННЯ

Контрольний вплив		Вплив мАт Н6		
Час до початку (хвилини)	Контроль	2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
	6,07	5,93	12,75	10,00
	1,07	6,95	2,53	10,33
	8,00	8,92	14,00	21,00
	2,40	11,92	3,05	11,50
	8,48	12,75	8,00	19,00
	4,00	12,53	8,17	10,37
	4,00		15,83	22,65
	7,83		11,70	16,37
	6,83		50,67	21,75*
	15,00			32,25*
	15,67			

*У судинах не спостерігали тромбозу протягом вказаного періоду спостереження

Результати статистичного аналізу, в якому порівнювали час до початку оклюзії у тварин, що отримували контрольне антитіло і мАт Н6, наведені нижче в ТАБЛИЦІ 15.

Таблиця 15:

ЧАС ДО ПОЧАТКУ ОКЛЮЗІЇ: ДАНА ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІДПОВІДІ ВІД ДОЗИ З ДОСЛІДЖЕННЯ З FITC-ДЕКСТРАНОМ

Статистичний параметр	Контроль	мАт Н6 (2 мг/кг)	мАт Н6 (10 мг/кг)	мАт Н6 (20 мг/кг)
Число подій/число тварин (%)	11/11 (100 %)	6/6 (100 %)	9/9 (100 %)	8/10 (80,0 %)
Середній час (хвилини) (95 % ДІ)	6,8 (2,4, 8,5)	10,4 (5,9, 12,8)	11,7 (2,5, 15,8)	17,7 (10,0, 22,7)
Критерій Вілкоксона, р-значення*		0,2364	0,1963	0,0016

Полія=Спостережуваний час до початку оклюзії

Середнє значення (хвилини) і його 95 % ДІ основані на оцінці Каплана-Мейєра

N/O=не піддається оцінці

*р-значення були скоректовані методом множинного порівняння Даннета-Хсу

5 Мікроваскулярна оклюзія

На ФІГУРІ 51 представлений графік Каплана-Мейєра, що показує процентну частку мишей з мікроваскулярною оклюзією, залежно від часу, в моделі індукованої FITC-декстраном тромботичної мікроангіопатії у мишей, що отримували зростаючі дози людського інгібуючого MASP-2 антитіла (мАт Н6 в дозах 2 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) або контрольне по ізотипу антитіло. Як показано на ФІГУРІ 51, повна мікроваскулярна оклюзія була відстрочена в групах мишей, що отримували мАт Н6, порівняно з контрольними мишами.

10 На ФІГУРІ 52 наведений графік, що показує середній час до мікроваскулярної оклюзії залежно від дози мАт Н6 (*р<0,05 порівняно з контролем). Як показано на ФІГУРІ 52, середній час до повної мікроваскулярної оклюзії збільшений від 23,3 хвилин в контрольній групі до 38,6 хвилин в групі отримання 2 мг/кг мАт Н6 (р<0,05). Дози 10 мг/кг або 20 мг/кг мАт Н6 діяли аналогічно (середній час до повної мікроваскулярної оклюзії становив 40,3 і 38 хвилин, відповідно) дозі 2 мг/кг мАт Н6. Експериментальні дані, що Служать основою і результати статистичного аналізу наведені в ТАБЛИЦЯХ 16 і 17.

15 Час до повної оклюзії судин у окремих мишей, зареєстрований на основі оцінки відеозапису, наведений нижче в ТАБЛИЦІ 16.

Таблиця 16:

ЧАС ДО ПОВНОЇ ОКЛЮЗІЇ ПІСЛЯ ІНДУКОВАНОГО СВІТЛОМ/БАРВНИКОМ ПОШКОДЖЕННЯ

Контрольний вплив		Вплив мАт Н6		
Час до оклюзії (хвилини)	Контроль	2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
	37,50	42,3	30,92	38,00
	29,07	21,91	17,53	28,00
	27,12	24,4	51,38	40,58
	19,38	31,38	36,88	33,00
	19,55	61,17*	26,83	39,10
	18,00	61,55*	40,28	32,03
	16,50		55,83	38,53
	23,33		71,93*	21,75*
	14,83		98,22*	32,25*
	30*			33,17*
	61,8*			

*У судинах була відсутня повна оклюзія протягом вказаного періоду спостереження.

Результати статистичного аналізу, в якому порівнювали час до повної оклюзії у тварин, що отримували контрольне антитіло і мАт Н6, наведені нижче в ТАБЛИЦІ 17.

Таблиця 17:

ЧАС ДО ПОВНОЇ МІКРОВАСКУЛЯРНОЇ ОКЛЮЗІЇ: ДАНА ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІДПОВІДІ ВІД ДОЗИ З ДОСЛІДЖЕННЯ З FITC-ДЕКСТРАНОМ

Статистичний параметр	Контроль	мАт Н6 (2 мг/кг)	мАт Н6 (10 мг/кг)	мАт Н6 (20 мг/кг)
Число подій/число тварин (%)	9/11 (81,8 %)	4/6 (66,7 %)	7/9 (77,8 %)	7/10 (70,0 %)
Середній час (хвилини) (95 % ДІ)	23,3 (16,5, 37,5)	36,8 (21,9, Н/О)	40,3 (17,5, Н/О)	38,0 (28,0, 40,6)
Критерій Вілкоксона, р-значення*		0,0456	0,0285	0,0260

Подія=Спостережуваний час до оклюзії

Середнє значення (хвилини) і його 95 % ДІ основані на оцінці Каплана-Мейєра

Н/О=не піддається оцінці

*р-значення були скориговані методом множинного порівняння Даннета-Хсу

Резюме

- 5 Як показано в ТАБЛИЦІ 18, початок утворення тромбів був відстрочений у мишей, що отримували мАт Н6 залежним від дози чином порівняно з мишами (середній час до початку 10,4-17,7 хвилин проти 6,8 хвилин). Середній час до повної оклюзії був значно збільшений у всіх групах тварин, що отримували мАт Н6, що відносно отримували контрольне антитіло тварин (Таблиця 18).

Таблиця 18:

СЕРЕДНІЙ ЧАС ДО ПОЧАТКУ УТВОРЕННЯ ТРОМБІВ І ПОВНОЇ ОКЛЮЗІЇ

	Контроль	мАт Н6 (2 мг/кг)	мАт Н6 (10 мг/кг)	мАт Н6 (20 мг/кг)
Середній# час до початку утворення тромбів (хвилини)	6,8	10,4	11,7	17,7*
Середній# час до повної мікроеваскулярної оклюзії (хвилини)	23,3	36,8*	40,3*	38,0*

Середні значення засновані на оцінці Каплана-Мейєра

*р<0,05 порівняно з контролем (критерій Вілкоксона, скоригований методом множинного порівняння Даннета-Хсу)

10

Ці результати показують, що мАт Н6, людське моноклональне антитіло, яке зв'язує MASP-2 і блокує лектиновий шлях системи комплементу, приводить до зменшення мікроеваскулярного тромбозу залежним від дози чином в експериментальній мишачій моделі TMA. Таким чином, очікується, що введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло, буде ефективним методом лікування пацієнтів, які страждають на HUS, aHUS, ТТП, або інших мікроангіопатичних захворювань, таких як інші TMA, включаючи катастрофічний антифосфоліпідний синдром (CAPS), системну хворобу Дегоса, а також TMA в результаті раку, протиракової хіміотерапії і трансплантації, і забезпечить захист від мікроеваскулярної коагуляції і тромбозу.

15

Приклад 40

У даному прикладі описана ідентифікація за допомогою фагового дисплея повністю людських scFv антитіл, які зв'язують MASP-2 і інгібують опосередковану лектином активацію комплементу, не торкаючись компоненти класичного (C1q-залежного) шляху і альтернативного шляху імунної системи.

25

Огляд

Повністю людські високоафінні анти-MASP-2 антитіла були ідентифіковані при скринінгу бібліотеки фагового дисплея. Фрагменти варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів антитіл були виділені як в форматі scFv, так і в форматі повнорозмірних IgG. Людські анти-

MASP-2 антитіла є корисними для інгібування пошкодження клітин, пов'язаного з опосередкованою лектиновим шляхом активацією альтернативного шляху комплементу, що не торкається компонент класичного (C1q-залежного) шляху імунної системи. У деяких варіантах здійснення вказані інгібуючі MASP-2 антитіла мають наступні характеристики: (а) високу афінність для людського MASP-2 (наприклад, величину K_D , що становить 10 нМ або менш) і (b) інгібують MASP-2-залежну активність комплементу в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менш.

Методи

Експресія повнорозмірного каталітично неактивного MASP-2:

Повнорозмірну послідовність кДНК людського MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодуючу поліпептид людського MASP-2 з послідовністю лідера (SEQ ID NO: 5), субклонували в експресійний вектор pCI-Neo (Promega) ссавців, який керує експресією під контролем області енхансера/промотору CMV в еукаріотичних клітинах (описано в Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (1991)).

Для отримання каталітично неактивного людського білка MASP-2A проводили сайт-направлений мутагенез, як описано в US2007/0172483, зміст якого включений в цей документ за допомогою посилання. Продукти ПЛР очищали після електрофорезу в агарозному гелі і обробки смуги, і створювали одиначне накладення аденозину з використанням стандартного методу нарощування ланцюга. MASP-2A з аденозиновим "хвостом" потім клонували у вектор pGEM-T easy і вводили трансформацією в *E. coli*. Людський MASP-2A додатково субклонували в якій-небудь з експресійних векторів pED або pCI-Neo ссавців.

Експресійний конструкт MASP-2A, описаний вище, трансфікували в клітини DXB1 стандартним методом трансфекції з фосфатом кальцію (Maniatis et al., 1989). MASP-2A отримували в безсироватковому середовищі для гарантії того, що препарати не будуть забруднені іншими сироватковими білками. Середовище збирали з конфлюентних клітин через день (усього чотири рази). Рівень рекомбінантного MASP-2A складав в середньому приблизно 1,5 мг/літр культурального середовища. Мутант MASP-2A (мутант Ser-Ala, описаний вище) очищали афінною хроматографією на колонці з MBP-A-агарозою.

MASP-2A ELISA клонів-кандидатів scFv, ідентифікованих шляхом сортування/перетворення scFv і фільтруючого скринінгу

Фагово-дисплейну бібліотеку послідовностей варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів людських імуноглобулінів піддавали сортуванню на антигенний, з подальшим автоматизованим скринінгом і відбором антитіл, для ідентифікації високоафінних scFv антитіл до людського білка MASP-2. Проводили три раунди сортування фагової бібліотеки scFv проти HIS-міченого або біотин-міченого MASP-2A. У третьому раунді сортування елюцію проводило спочатку за допомогою MBL, а потім TEA (лужного). Для моніторингу специфічного збагачення фагів, що експонують фрагменти scFv проти цільового MASP-2A, проводили ELISA поліклональних фагів проти іммобілізованого MASP-2A. Гени scFv, отриманих в раунді 3 сортування, клонували в експресійний вектор pHOG і використовували в дрібномасштабному фільтруючому скринінгу для виявлення специфічних клонів проти MASP-2A.

Колонії бактерій, що містять плазміди, що кодують фрагменти scFv з третього раунду сортування, відбирали, наносили у вигляді сітки на нітроцелюлозні мембрани і вирощували протягом ночі на не індукуючому середовищі для отримання майстра-чашок. Усього було відібрано і проаналізоване 18000 колоній з третього раунду сортування, половина після конкурентної елюції і половина після подальшої елюції TEA. Сортування фагмідної бібліотеки scFv проти MASP-2A, з подальшим перетворенням scFv і фільтруючим скринінгом, привели до отримання 137 позитивних клонів. 108/137 клонів були позитивні в аналізі ELISA на зв'язування MASP-2 (дані не представлені), з яких 45 клонів були додатково проаналізовані на здатність до блокування активності MASP-2 в нормальній людській сироватці.

Аналіз для вимірювання інгібування утворення C3-конвертази лектинового шляху

Функціональний аналіз, що дозволяє вимірювати інгібування утворення C3-конвертази лектинового шляху, використовували для оцінки "блокуючої активності" клонів-кандидатів анти-MASP-2 scFv. Активність серинової протеази MASP-2 необхідна для утворення двох білкових компонентів (C4b, C2a), які складають C3-конвертазу лектинового шляху. Внаслідок цього, анти-MASP-2 scFv антитіло, яке інгібує функціональну активність MASP-2 (тобто, блокуюче анти-MASP-2 scFv), буде інгібувати *de novo* утворення C3-конвертази лектинового шляху. C3 містить незвичайну і високе реакційноздатну тіоефірну групу в своїй структурі. Після розщеплення C3 C3-конвертазою в цьому аналізі, тіоефірна група на C3b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок за рахунок складноефірних або амідних зв'язків, це полегшує виявлення C3b в аналізі ELISA.

Дріжджовий манан є відомим активатором лектинового шляху. У наступному способі вимірювання утворення C3-конвертази пластиківі ямки, покриті мананом, інкубували протягом 30 хв при 37 °C з розбавленою щурячою сироваткою для активації лектинового шляху. Потім ямки промивали і аналізували на C3b, іммобілізований в ямку, стандартними методами ELISA.

5 Кількість C3b, що утворився в даному аналізі, напряму відображає de novo утворення C3-конвертази лектинового шляху. Клоні анти-MASP-2 scFv у вибраних концентраціях тестували в даному аналізі на їх здатність інгібувати утворення C3-конвертази і подальшу утворення C3b.

Методи

45 клонів-кандидатів, ідентифікованих, як описано вище, були експресовані, очищені і розбавлені до однієї і тієї ж концентрації маточних розчинів, які знову розбавляли буфером GVB, який містить Ca⁺⁺ і Mg⁺⁺ (4,0 mM барбітал, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, 2,0 mM CaCl₂, 0,1 % желатин, pH 7,4), для гарантії того, що все клони мають однакову кількість буфера. Кожний з клонів scFv тестували в трьох повторах в концентрації 2 мкг/мл. Позитивним контролем служило Fab2 OMS100, яке тестували в концентрації 0,4 мкг/мл. Утворення C3с контролювали в присутності і при відсутності клонів scFv/IgG.

Манан розбавляли до концентрації 20 мкг/мл (1 мкг/ямку) в 50 mM карбонатному буфері (15 mM Na₂CO₃+35 mM NaHCO₃+1,5 mM NaN₃), pH 9,5, і наносили для покриття планшетів ELISA протягом ночі при 4 °C. На наступний день покриті мананом планшети промивали 3 рази по 200 мкл PBS. Потім в ямку додавали по 100 мкл блокуючого розчину 1 % HSA і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 3 рази по 200 мкл PBS і зберігали на льоду з 200 мкл PBS до додавання зразків.

Нормальну людську сироватку розбавляли до 0,5 % в буфері GVB з Ca⁺⁺ і Mg⁺⁺, клони scFv, або позитивний контроль Fab2 OMS100, додавали в трьох повторах в концентрації 0,01 мкг/мл; 1 мкг/мл (тільки контроль OMS100) і 10 мкг/мл до цього буфера і преінкубували 45 хвилин на льоду перед доданням в ELISA планшети для аналізу блокування. Реакцію починали шляхом інкубації протягом однієї години при 37 °C і зупиняли, переносючи планшети в крижану баню. Відкладення C3b виявляли за допомогою антитіла кролика проти мишачого C3с, з подальшим доданням кон'югованих з HRP антитіл кози проти імуноглобулінів кролика. Негативним контролем служив буфер без антитіла (без антитіла=максимального відкладення C3b), і позитивним контролем служив буфер з EDTA (без відкладення C3b). Рівень фону визначали шляхом проведення того ж аналізу, за винятком того, що ямки не містили манан. Фонівий сигнал в ямках без манану віднімали з сигналів в ямках, які містять манан. Критерій порога відсікання був встановлений на рівні половини активності стороннього клона scFv (VZV) і одного тільки буфера.

Результати

На основі критерію порога відсікання всього було виявлено 13 клонів, що блокують активність MASP-2. Все 13 клонів, що забезпечують придушення активності шляху на рівні >50 %, були вибрані і секвеновані, що привело до отримання 10 унікальних клонів. Було встановлено, що всі десять клонів мали легкі ланцюги одного і того ж підкласу, λ3, але важкі ланцюги трьох різних підкласів: VH2, VH3 і VH6. У функціональному аналізі п'ять з десяти клонів-кандидатів scFv мали значення IC₅₀ в нМ вираженні, менші, ніж цільовий критерій 25 нМ, при використанні 0,5 % людської сироватки.

Для отримання антитіл з підвищеною ефективністю три батьківських клона scFv, ідентифіковані, як описано вище, піддавали перетасовуванню легких ланцюгів. Цей процес включав отримання комбінаторної бібліотеки, що складається з VH кожного з батьківських клонів в парі з бібліотекою нативних людських легких ланцюгів лямбда (VL), отриманою від трьох здорових донорів. Цю бібліотеку потім піддавали скринінгу на клони scFv з поліпшеної афінністю зв'язування і/або функціональністю.

Таблиця 19:

ПОРІВНЯННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ, ВИРАЖЕНОЇ В IC₅₀ (нМ), ВЕДУЧИХ ДОЧІРНИХ КЛОНІВ І ЇХ ВІДПОВІДНИХ БАТЬКІВСЬКИХ КЛОНІВ (ВСЕ В ФОРМАТІ scFv)

Клон scFv	1 % людська сироватка Аналіз C3 (IC ₅₀ , нМ)	90 % людська сироватка Аналіз C3 (IC ₅₀ , нМ)	90 % людська сироватка Аналіз C4 (IC ₅₀ , нМ)
17D20mc	38	н/о	н/о
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	н/о	н/о

17N16m_d17N9	48	15	230
--------------	----	----	-----

Нижче наведені послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) для батьківських клонів і дочірніх клонів, указаних вище в ТАБЛИЦІ 19.

Послідовності CDR по Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-107 (H3)) виділені жирним шрифтом; і CDR по Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) і 95-101 (H3)) підкреслені.

17D20_35VH-21N11VL, варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH) (SEQ ID NO: 67, закодована SEQ ID NO: 66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL**SRGKM**GVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSL
KSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARIR**GGIDY**WGQGLTVTVSS

d17N9, варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH) (SEQ ID NO: 68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS**SSTA**AWNIRQSPSRGLEWLGRTYYR**SKWYNDY**
AVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARD**PF**GV**PF**DIWGQGTMTVTVSS

Нижче наведені послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) для батьківських клонів і дочірніх клонів.

CDR по Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2) і 89-97 (L3)) виділені жирним шрифтом; і CDR по Chothia (24-34 (L1); 50-56 (L2) і 89-97 (L3)) підкреслені. Ці ділянки є однаковими при нумерації відповідно до системи або Kabat, або Chothia.

17D20m_d3521N11, варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL) (SEQ ID NO: 70, закодована SEQ ID NO: 69)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYWY**QQKPGQSPVLVMYQ**DKQ**RP**SG**IPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAV**FGGGTKLTVL

17N16m_d17N9, варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL) (SEQ ID NO: 71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHWY**QQRPGQAPVLVIYD**SDSR**PSGIPDRFSASN
SGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

Анти-MASP-2 антитіла OMS100 і моАт_d3521N11VL (що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга с SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга с SEQ ID NO: 70, також називається "OMS646" і "мАт Н6"), оба з яких, як було продемонстровано, зв'язують людський MASP-2 з високою афінністю і мають здатність блокувати функціональну активність комплексу, аналізували відносно зв'язування епітопів в дот-блот аналізі. Результати показали, що антитіла OMS646 і OMS100 є високоспецифічними для MASP-2 і не зв'язують MASP-1/3. Жодне з антитіл не зв'язує МАР19 або фрагменти MASP-2, які не містять домен CCP1 MASP-2, це дозволяє вважати, що сайти зв'язування включають CCP1.

Анти-MASP-2 антитіло OMS646, як показано, авідно зв'язує рекомбінантний MASP-2 (K_D 60-250 пМ) з >5000-кратною вибірковістю порівняно з C1s, C1r або MASP-1 (дивись ТАБЛИЦЮ 20 нижче):

Таблиця 20:

АФІННІСТЬ І СПЕЦИФІЧНІСТЬ ВЗАЄМОДІЇ
АНТИ-MASP-2 АНТИТІЛА OMS646 З MASP-2
ПРИ ОЦІНЦІ В ТВЕРДОФАЗНОМ АНАЛІЗІ
ELISA

Антиген	K_D (пМ)
MASP-1	>500000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500000
Очищений людський C1r	>500000
Очищений людський C1s	~500000

*Середнє значення ± SD; n=12

OMS646 специфічно блокує лектин-залежну активацію термінальних компонентів комплексу

Методи

Ефект OMS646 на відкладення мембраноатакуючого комплексу (MAC) аналізували з використанням умов, специфічних для шляху: для лектинового шляху, класичного шляху і альтернативного шляху. Для цієї мети використовували набір для скринінгу комплексу Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) відповідно до інструкцій виробника.

Результати

На ФІГУРІ 53А наведений графік, що показує рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах, специфічних для лектинового шляху. На ФІГУРІ 53В наведений графік, що показує рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах, специфічних для класичного шляху. На ФІГУРІ 53С наведений графік, що показує рівень відкладення MAC в присутності або при відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах, специфічних для альтернативного шляху.

Як показано на ФІГУРІ 53А, OMS646 блокує активацію відкладення MAC, опосередковану лектиновим шляхом, з величиною IC_{50} приблизно 1 нМ. Однак OMS646 не впливає на відкладення MAC, що відбувається внаслідок опосередкованої класичним шляхом активації (ФІГУРА 53В) або опосередкованої альтернативним шляхом активації (ФІГУРА 53С).

Фармакокінетика і фармакодинаміка OMS646 після внутрішньовенного (в/в) або підшкірного (п/ш) введення мишам

Фармакокінетику (ФК) і фармакодинаміку (ФД) OMS646 оцінювали в 28-денному дослідженні ФК/ФД на мишах з однократним введенням дози. У дослідженні тестували рівні дози 5 мг/кг і 15 мг/кг OMS646 при підшкірному (п/ш) введенні, а також рівень дози 5 мг/кг OMS646 при внутрішньовенному (в/в) введенні.

Що стосується ФК профілю OMS646, на ФІГУРІ 54 наведений графік, що показує концентрацію OMS646 (середнє для $n=3$ тварин/групи) залежно від часу після введення OMS646 у вказаній дозі. Як показано на ФІГУРІ 54, при п/ш дозі 5 мг/кг OMS646 досягало максимальної концентрації в плазмі 5-6 мкг/мл приблизно через 1-2 дні після дозування. Біодоступність OMS646 при п/ш дозі 5 мг/кг становила приблизно 60 %. Як також показано на ФІГУРІ 54, при п/ш дозі 15 мг/кг OMS646 досягало максимальної концентрації в плазмі 10-12 мкг/мл через приблизно 1-2 дні після дозування. У всіх групах OMS646 повільно виводилося з системи кровообігу з кінцевим періодом напіввиведення приблизно 8-10 днів. Профіль OMS646 є типовим для людських антитіл в організмі миші.

ФД активність OMS646 графічно представлена на ФІГУРАХ 55А і 55В. На ФІГУРАХ 55А і 55В показаний ФД відповідь (падіння системної активності лектинового шляху) для кожної миші в групах в/в дози 5 мг/кг (ФІГУРА 55А) і п/ш дози 5 мг/кг (ФІГУРА 55В). Пунктирна лінія показує базовий рівень в аналізі (максимальне інгібування; нормальна мишача сироватка з доданим *in vitro* перед аналізом надлишком OMS646). Як показано на ФІГУРІ 55А, після в/в введення дози 5 мг/кг OMS646 системна активність лектинового шляху негайно падала до рівнів, що майже не піддаються визначенню, і активність лектинового шляху демонструвала лише помірне відновлення протягом 28-денного періоду спостереження. Як показано на ФІГУРІ 55В, у мишей, що отримували п/ш дозу 5 мг/кг OMS646, спостерігалось залежне від часу інгібування активності лектинового шляху. Активність лектинового шляху падала до рівнів, що майже не піддаються визначенню в межах 24 годин після введення лікарського засобу і залишалася на низьких рівнях протягом щонайменше 7 днів. Активність лектинового шляху поступово збільшувалася згодом, але не поверталася до рівнів до введення дози протягом 28-денного періоду спостереження. Профіль залежності активності лектинового шляху від часу, що спостерігається після введення п/ш дози 15 мг/кг, був аналогічний такому після введення п/ш дози 5 мг/кг (дані не представлені), це вказувало на насичення ФД кінцевої точки. Дані також вказували на те, що щотижнева доза 5 мг/кг OMS646, що вводиться або в/в, або п/ш, є достатньою для досягнення безперервного придушення системної активності лектинового шляху у мишей.

Приклад 41

У даному прикладі показано, що інгібуюче MASP-2 антитіло (OMS646) інгібує aHUS, що індукується сироваткою відкладення C5b-9 комплекменту на поверхні активованих людських мікроvasкулярних ендотеліальних клітин (HMEC-1) після впливу сироватки від пацієнтів з атипичним гемолітичним уремичним синдромом (aHUS), отриманій під час гострої фази і фази ремісії захворювання.

Передумови/обґрунтування

Проводили наступне дослідження для аналізу aHUS, що індукується сироваткою відкладення C5b-9 комплекменту на поверхні активованих клітин HMEC-1 після впливу сироватки пацієнтів з aHUS, отриманої (1) під час гострої фази і (2) під час фази ремісії захворювання, в присутності або при відсутності OMS646, анти-MASP-2 антитіла, яке специфічно зв'язує MASP-2 і інгібує активацію лектинового шляху.

Методи

Пацієнти

Чотири пацієнти з aHUS, вивчені як під час гострої фази захворювання, так і під час ремісії,

були вибрані для даного дослідження з числа людей, включених в Міжнародний реєстр HUS/ТТП, і генотиповані в лабораторії імунології і генетики Інституту трансплантації і рідких хвороб ім. Маріо Негрі. Один пацієнт з aHUS мав гетерозиготну мутацію p.R1210C фактора Н комплементу (CFH) і один мав анти-CFH аутоантитіла, в той час як у інших двох пацієнтів з aHUS мутації або антитіла до CFH не були виявлені.

У ТАБЛИЦЯХ 21 і 22 підсумовувані результати скринінгу на мутації генів компонентів комплементу і анти-CFH аутоантитіла у чотирьох пацієнтів з aHUS, проаналізованих в даному дослідженні, нарівні з клінічними і біохімічними даними, отриманими або під час гострої фази, або під час ремісії.

Таблиця 21:

КЛІНІЧНІ ПАРАМЕТРИ ЧОТИРЬОХ ПАЦІЄНТІВ З aHUS В ДАНОМУ ДОСЛІДЖЕННІ

Пацієнт	Мутація або анти-CFH Ат	Фаза захворювання	Тромбоцити (150-400*10 ³ /мкл)	LDH (266-500 МО/л)	Гемоглобін (14-18 г/дл)	с-креатинін (0,55-1,25 мг/дл)
№№1	без мутацій, без анти-CFH Ат	гостра	31000	1396	12,9	2,37
		ремісія	267000	н/в	11,5	3,76
№№2	CFH-R1210C	гостра	46000	1962	7	5,7
		ремісія	268000	440	13,4	7,24
№№3	анти-CFH Ат	гостра	40000	3362	9,5	1,77
		ремісія	271000	338	8,8	0,84
№№4 №	без мутацій, без анти-CFH Ат	гостра	83000	1219	7,8	6,8
		ремісія	222000	495	12,2	13

Примітка: н/в=не визначене

Таблиця 22:

ПАРАМЕТРИ КОМПЛЕМЕНТУ У ЧОТИРЬОХ ПАЦІЄНТІВ З aHUS В ДАНОМУ ДОСЛІДЖЕННІ

Пацієнт	Мутація або анти-CFH Ат	Фаза захворювання	C3 у сироватці (83-180 мг/дл)	SC5b-9 в плазмі (127-400 нг/мл)
№1	без мутацій, без анти-CFH Ат	гостра	51	69
		ремісія	н/о	117
№2	CFH-R1210C	гостра	79	421
		ремісія	119	233
№3	анти-CFH Ат	гостра	58	653
		ремісія	149	591
№4	без мутацій, без анти-CFH Ат	гостра	108	н/о
		ремісія	н/о	н/о

Експериментальні методи

Клітини клітинної лінії людського мікровазкулярного ендотелію (HMEC-1), отриманої з шкіри, висівали на скляні слайди і використовували в стані конфлюентності. Конфлюентні клітини HMEC-1 активували 10 мкМ АДФ (аденозиндифосфат) протягом 10 хвилин, а потім інкубували протягом чотирьох годин з сироваткою від чотирьох пацієнтів з aHUS, описаних вище в ТАБЛИЦЯХ 23 і 24, зібраній або під час гострої фази захворювання, або від тих же пацієнтів з aHUS під час ремісії, або від 4 здорових контрольних суб'єктів. Сироватку розбавляли 1:2 аналітичним середовищем (HBSS з 0,5 % BSA) в присутності або при відсутності інгібуєного MASP-2 антитіла, OMS646 (100 мкг/мл), отриманого, як описано вище в прикладі 40, або в присутності розчинного рецептора 1 комплементу (sCR1) (150 мкг/мл), як позитивний контроль інгібування комплементу. Після завершення етапу інкубації клітини HMEC-1 обробляли кролячим антитілом проти людського C5b-9 комплементу, а потім FITC-кон'югованим вторинним антитілом. У кожному експерименті тестували сироватку від одного здорового контрольного суб'єкта паралельно з сироваткою пацієнта з aHUS (в гострій фазі і в ремісії). Використовували

конфокальний інвертований лазерний мікроскоп для отримання зображень флуоресцентного фарбування на поверхні ендотеліальних клітин. Отримували зображення п'ятнадцяти полів для кожного зразка, площу флуоресцентного фарбування оцінювали шляхом автоматизованого розпізнавання контурів зображення з використанням вбудованих спеціальних функцій програми Image J і виражали у вигляді кількості пікселів² на кожне аналізоване поле. Поля з найнижчими і найвищими значеннями виключали з розрахунків.

Для статистичного аналізу (односторонній аналіз ANOVA, з подальшим критерієм Тукі для множинних порівнянь) результати в пікселях² 13 полів розглядали в кожному експериментальному стані для кожного пацієнта, і також використовували контролю.

Результати

Результати аналізу відкладення комплементу з використанням сироваток від чотирьох пацієнтів з aHUS наведені нижче в ТАБЛИЦІ 23A, і результати з сироваткою від чотирьох здорових суб'єктів наведені нижче в ТАБЛИЦІ 23B.

Таблиця 23A:

ЕФЕКТ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕМЕНТУ НА ІНДУКОВАНЕ aHUS СИРОВАТКОЮ ВІДКЛАДЕННЯ C5b-9 НА АДФ-АКТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ НМЕС-1

Пацієнт с aHUS №	Гостра фаза aHUS			Фаза ремісія aHUS		
	без обробки	+sCR1	+OMS646	без обробки	+sCR1	+OMS646
Пацієнт № 1 (без мутацій, без анти-CFH Ат)	5076±562°	551±80*	3312±422**	4507±533°	598±101§	1650±223§
Пацієнт № 2 (CFH-R1210C)	5103±648°	497±67*	2435±394*	3705±570°	420±65§	2151±250§§§
Пацієнт № 3 (анти-CFH Ат)	3322±421°	353±64*	2582±479	6790±901°	660±83§	2077±353§
Пацієнт № 4 (без мутацій, без анти-CFH Ат)	4267±488°	205±34*	2369±265**	5032±594°	182±29§	3290±552§§

Таблиця 23B:

ЕФЕКТ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕМЕНТУ НА СИРОВАТКУ ВІД ЧОТИРЬОХ ЗДОРОВИХ КОНТРОЛЬНИХ СУБ'ЄКТІВ (ЯКІ НЕ СТРАЖДАЮТЬ ВІД aHUS) В АНАЛІЗІ НА ВІДКЛАДЕННЯ C5b-9 НА АДФ-АКТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ НМЕС-1

Здоровий контрольний суб'єкт №	Без обробки	+sCR1	+OMS646
Контрольний суб'єкт № 1 (аналіз паралельно з суб'єктом №1 з aHUS)	481±66	375±43	213±57
Контрольний суб'єкт № 2 (аналіз паралельно з суб'єктом №2 з aHUS)	651±61	240±33	490±69
Контрольний суб'єкт № 3 (аналіз паралельно з суб'єктом №3 з aHUS)	602±83	234±35	717±109
Контрольний суб'єкт № 4 (аналіз паралельно з суб'єктом №4 з aHUS)	370±53	144±20	313±36

Для ТАБЛИЦЬ 23A і 23B: дані являють собою середні значення $\pm$ SE. °P<0,001 проти контролю; *P<0,001, **P<0,01 проти aHUS в гострій фазі, без обробки; §P<0,001, §§P<0,01, §§§P<0,05 проти aHUS в фазі ремісії, без обробки.

На ФІГУРІ 56 наведений графік, що показує інгібуючий ефект анти-MASP-2 антитіла (OMS646) і sCR1 на індуковане aHUS сироваткою відкладення C5b-9 на АДФ-активованих клітинах НМЕС-1. На ФІГУРІ 56 дані являють собою середні значення $\pm$ SE. °P<0,0001 проти контролю; *P<0,0001 проти aHUS в гострій фазі, без обробки; ^P<0,0001 проти aHUS в гострій фазі+sCR1; зP<0,0001 проти aHUS в фазі ремісії, без обробки і #P<0,0001 проти aHUS в фазі ремісії+sCR1.

Як показано в ТАБЛИЦІ 23А, 23В і на ФІГУРІ 56, АДФ-стимульовані клітини НМЕС-1, піддані впливу сироватки від пацієнтів з аНУС (зібраної або в гострій фазі, або в фазі ремісії) протягом чотирьох годин в статичних умовах, мали велике відкладення С5b-9 на клітинній поверхні, виявлене методом конфокальної мікроскопії. При вимірюванні площі, покритої С5b-9, значно

більший ступінь відкладення С5b-9 спостерігали на клітинах, підданих впливу сироватки від пацієнтів з аНУС, ніж на клітинах, підданих впливу сироватки від здорових контрольних суб'єктів, незалежно від того, чи була аНУС сироватка зібрана в гострій фазі або під час ремісії. Які-небудь відмінності в індукованому сироваткою відкладенні С5b-9 на ендотелію були відсутні між гострою фазою і ремісією.

Як також показано в ТАБЛИЦІ 23А, 23В і на ФІГУРІ 56, додавання анти-MASP-2 антитіла OMS646 до аНУС сироватки (отриманої від пацієнтів або в гострій фазі, або під час ремісії) приводило до значного зменшення відкладення С5b-9 на поверхні ендотеліальних клітин порівняно з необробленою аНУС сироваткою. Однак інгібуючий ефект OMS646 на відкладення С5b-9 був менш виражений, ніж ефект, що проводиться пан-інгібітором комплементу sCR1.

Дійсно, статистично значущу відмінність спостерігали між індукованим аНУС сироваткою відкладенням С5b-9 в присутності OMS646 порівняно з sCR1 (ФІГУРА 56 і ТАБЛИЦІ 23А і 23В).

При розрахунку середнього значення для чотирьох пацієнтів з аНУС спостерігали наступне процентне зменшення відкладення С5b-9 (порівняно з відкладенням С5b-9, індукованим необробленою сироваткою від тих же пацієнтів, прийнятим за 100 %) в присутності інгібіторів комплементу:

Гостра фаза:

sCR1 (150 мкг/мл): зменшення на 91 % відкладення С5b-9

OMS646 (100 мкг/мл): зменшення на 40 % відкладення С5b-9

Фаза ремісії:

sCR1 (150 мкг/мл): зменшення на 91 % відкладення С5b-9

OMS646 (100 мкг/мл): зменшення на 54 % відкладення С5b-9

Висновок

Результати, описані в даному прикладі, демонструють, що лектиновий шлях комплементу стимулюється активованими мікроваскулярними ендотеліальними клітинами, і що ця

стимуляція є важливим фактором для надмірної активації комплементу, характерної для аНУС.

Також було показано, що ця стимуляція лектинового шляху і, як наслідок, надмірна активація комплементу відбувається як під час гострої фази, так і під час клінічної ремісії аНУС. Більш того цей результат, судячи з усього, не обмежений яким-небудь конкретним дефектом комплементу, пов'язаним з аНУС. Як також продемонстровано в цьому прикладі, вибіркового інгібування лектинового шляху інгібуючим MASP-2 антитілом, таким як OMS646, приводить до зменшення відкладення комплементу у пацієнтів з аНУС різної етіології.

Приклад 42

У даному прикладі показано, що інгібуюче MASP-2 антитіло (OMS646) інгібує індуковану аНУС сироваткою агрегацію тромбоцитів і утворення тромбів на поверхні активованих людських мікроваскулярних ендотеліальних клітин (НМЕС-1) після впливу сироватки пацієнтів з аНУС, отриманої під час (1) гострої фази і (2) фази ремісії аНУС.

Методи

Пацієнти

Три пацієнти (пацієнти № 1, № 2 і № 4, описані в ТАБЛИЦЯХ 21, 22, 23А і 23В в прикладі 41) з аНУС (один пацієнт мав гетерозиготну мутацію p.R1210C CFH, в той час як мутації або анти-CFH антитіла не були виявлені у інших двох пацієнтів) були вивчені як під час гострої фази захворювання, так і під час ремісії. Пацієнти були вибрані для даного дослідження з числа людей, включених в Міжнародний реєстр HUS/ТТП, і генотиповані в лабораторії імунології і генетики Інституту трансплантації і рідких хвороб ім. Маріо Негрі. П'ять здорових суб'єктів також були вибрані як донори крові для експериментів з перфузією.

Методи

Конфлюентні клітини НМЕС-1 активували 10 мкМ АДФ протягом 10 хвилин, а потім інкубували протягом трьох годин з сироваткою від трьох пацієнтів з аНУС (пацієнти № 1, 2 і 4, описані в прикладі 41), зібраної під час гострої фази захворювання, або від тих же пацієнтів в фазі ремісії, або з контрольною сироваткою від здорових суб'єктів. Сироватку розбавляли 1:2 аналітичним середовищем (HBSS з 0,5 % BSA) в присутності або при відсутності інгібуючого MASP-2 антитіла, OMS646 (100 мкг/мл), отриманого, як описано вище в прикладі 40, або в присутності sCR1 (150 мкг/мл) як позитивний контроль інгібування комплементу. У випадку пацієнтів № 1 і № 2 додаткова ямку інкубували з сироваткою (отриманої в гострій фазі і під час ремісії), розбавленою 1:2 аналітичним середовищем, що містить 100 мкг/мл сторонній

контрольного по ізотипу антитіла або 20 мкг/мл OMS646 (для останнього тестували сироватку пацієнта № 1, отриману тільки в фазі ремісії, і тестували сироватку пацієнта № 2, отриману як під час гострої фази, так і в фазі ремісії).

Після завершення етапу інкубації проводили перфузію клітин НМЕС-1 в проточній камері гепаринізованою цільною кров'ю (10 МО/мл), отриманою від здорових суб'єктів (що містить флуоресцентний барвник акрихін, який мітить тромбоцити) при напруженні зсуву, що має місце в мікроциркуляції (60 дин/см², три хвилини). Після трьох хвилин перфузії, моношари ендотеліальних клітин фіксували в ацетоні. П'ятнадцять зображень для кожного зразка тромбоцитарних тромбів на поверхні ендотеліальних клітин отримували за допомогою конфокального інвертованого лазерного мікроскопа, і площі, зайняті тромбами, оцінювали з використанням програми Image J. Поля з найнижчими і найвищими значеннями виключали з розрахунків.

Для статистичного аналізу (односторонній аналіз ANOVA, з подальшим критерієм Тукі для множинних порівнянь) результати в пікселях² 13 полів розглядали в кожному експериментальному стані для кожного пацієнта, і також використовували контролю.

Результати

Результати експериментів з утворенню тромбів з сироваткою від трьох пацієнтів з aHUS наведені нижче в ТАБЛИЦІ 24А, і результати з сироваткою від п'яти здорових суб'єктів наведені нижче в ТАБЛИЦІ 24В.

Таблиця 24А:

ЕФЕКТ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕМЕНТУ НА ІНДУКОВАНЕ aHUS СИРОВАТКОЮ УТВОРЕННЯ ТРОМБІВ (ПІКСЕЛІ² ± SE) НА АДФ-АКТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ НМЕС-1

Експериментальні умови	Фаза захворювання	Пацієнт з aHUS № 1 утворення тромбів (пікселі ² ± SE) (без мутацій, без анти-CFH Ат)	Пацієнт з aHUS № 2 утворення тромбів (пікселі ² ± SE) (CFH-R1210C)	Пацієнт з aHUS № 4 утворення тромбів (пікселі ² ± SE) (без мутацій, без анти-CFH Ат)
Без обробки	гостра	5499±600	22320±1273°	10291±1362°
	ремісія	6468±1012°	3387±443°	17676±1106°
+sCR1 (150 мкг/мл)	гостра	4311±676	5539±578*	5336±1214***
	ремісія	573±316§	977±102§	2544±498§
+OMS646 (20 мкг/мл)	гостра	не визначено	6974±556*	не визначено
	ремісія	832±150§	1224±252§	не визначено
+OMS646 (100 мкг/мл)	гостра	3705±777	9913±984*	2836±509*
	ремісія	3321±945§§§	733±102§	1700±321§
+ стороннє по ізотипу антитіло (100 мкг/мл)	гостра	5995±725	18655±1699	не визначено
	ремісія	10885±1380	2711±371	не визначено

Таблиця 24В:

ЕФЕКТ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕМЕНТУ НА СИРОВАТКУ ВІД П'ЯТИ ЗДОРОВИХ КОНТРОЛЬНИХ СУБ'ЄКТІВ (НЕ СТРАЖДАЮЧИХ ВІД aHUS) В АНАЛІЗІ НА УТВОРЕННЯ ТРОМБІВ (ПІКСЕЛІ² ± SE) НА АДФ-АКТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ НМЕС-1

Експериментальні умови	Контроль № 1 утворення тромбів (пікселі ² ± SE)	Контроль № 2 утворення тромбів (пікселі ² ± SE)	Контроль № 3 утворення тромбів (пікселі ² ± SE)	Контроль № 4 утворення тромбів (пікселі ² ± SE)	Контроль № 5 утворення тромбів (пікселі ² ± SE)
Без обробки	2880±510	1046±172	1144±193	735±124	2811±609
+sCR1 (150 мкг/мл)	5192±637	1527±153	1198±138	2239±243	2384±410
+OMS646 (100 мкг/мл)	7637±888	1036±175	731±203	2000±356	7177±1477

Таблиця 24В:

ЕФЕКТ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕМЕНТУ НА СИРОВАТКУ ВІД П'ЯТИ ЗДОРОВИХ КОНТРОЛЬНИХ СУБ'ЄКТІВ (НЕ СТРАЖДАЮЧИХ ВІД aHUS) В АНАЛІЗІ НА УТВОРЕННЯ ТРОМБІВ (ПІКСЕЛІ2 ± SE) НА АДФ-АКТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ НМЕС-1

+ стороннє контрольне по ізотипу антитіло (100 мкг/мл)	6325±697	1024±235	399±82	45269	не визначено
Аналізовано паралельно сироваткою суб'єкта з aHUS	№ 1 (сироватка гострої фази)	№ 1 (сироватка фази ремісії)	№ 2 (сироватка гострої фази)	№ 2 (сироватка фази ремісії)	№ 5 (сироватка гострої фази і фази ремісії)

Для ТАБЛИЦЬ 24А і 24В: дані являють собою середні значення ± SE. °P<0,001 проти контролю; *P<0,001, ***P<0,05 проти aHUS в гострій фазі, без обробки; зP<0,001, зззP<0,05 проти aHUS в фазі ремісії, без обробки.

5 На ФІГУРІ 57 наведений графік, що показує ефект анти-MASP-2 антитіла (OMS646) і sCR1 на індуковане aHUS сироваткою утворення тромбів на АДФ-активованих клітинах НМЕС-1. На ФІГУРІ 57 дані являють собою середні значення ± SE. °P<0,0001, °P<0,01 проти контролю; *P<0,0001, **P<0,01 проти aHUS в гострій фазі, без обробки; зP<0,0001 проти aHUS в фазі ремісії, без обробки.

10 Як показано в ТАБЛИЦІ 24А і на ФІГУРІ 57, помітне збільшення площі, покритої тромбами, спостерігалось на клітинах НМЕС-1, оброблених aHUS сироваткою, зібраною або в гострій фазі, або в фазі ремісії, порівняно з клітинами, підданими впливу сироватки від здорових контрольних суб'єктів (ТАБЛИЦЯ 24В і ФІГУРА 57). Як показано на ФІГУРІ 57 і в ТАБЛИЦІ 24А, OMS646 (в обох концентраціях, 100 мкг/мл і 20 мкг/мл) приводило до часткового інгібування утворення тромбів на клітинах, заздалегідь підданих впливу aHUS сироватки, отриманої під час гострої фази. Антитромбогенний ефект був порівнянний при використанні двох різних доз OMS646 і не відрізнявся від ефекту sCR1 (ФІГУРА 57 і ТАБЛИЦЯ 24А). Додавання стороннього контрольного по ізотипу антитіла не приводило до інгібування індукованого aHUS сироваткою утворення тромбів.

20 Як також показано на ФІГУРІ 57 і в ТАБЛИЦІ 24А, інгібуючий ефект OMS646 був ще більш очевидним у випадку aHUS сироватки, зібраної під час фази ремісії. Дійсно, додавання OMS646, в обох дозах, 100 мкг/мл і 20 мкг/мл, до сироватки пацієнта з aHUS, зібраної під час ремісії, приводило до майже повному інгібування утворення тромбів, аналогічно тому, що спостерігалось при додаванні sCR1. Стороннє контрольне по ізотипу антитіло не надавало істотного інгібуючого ефекту.

25 При розрахунку середнього значення для трьох пацієнтів з aHUS спостерігали наступне процентне зменшення поверхні НМЕС-1, покритої відкладенням тромбів (порівняно з площею тромбів, індукованою необробленою сироваткою від тих же пацієнтів, прийнятою за 100 %), в присутності інгібіторів комплементу:

30 Гостра фаза:
sCR1 (150 мкг/мл): зменшення на 60 %
OMS646 (100 мкг/мл): зменшення на 57 %
OMS646 (20 мкг/мл): зменшення на 45 %
Фаза ремісії:
35 sCR1 (150 мкг/мл): зменшення на 85 %
OMS646 (100 мкг/мл): зменшення на 79 %
OMS646 (20 мкг/мл): зменшення на 89 %
Обговорення результатів

40 Результати в даному прикладі показують, що інгібуюче MASP-2 антитіло, таке як OMS646 (отримане, як описано в прикладі 40), надає сильний інгібуючий ефект на індуковане aHUS сироваткою утворення тромбів на клітинах НМЕС-1. Дивно, але інгібуючий ефект OMS646 на утворення тромбів був більше, ніж його ефект на індуковане відкладення C5b-9 на клітинах НМЕС-1 (як описано в прикладі 41). Також дивно, що додавання OMS646, в обох дозах, 100 мкг/мл і 20 мкг/мл, до сироватки пацієнтів з aHUS, зібраної під час фази ремісії, приводило до майже повного інгібування утворення тромбів. Також дивним є те спостереження, що OMS646, як у випадку гострої фази, так і у випадку ремісії, було так само ефективно, як позитивний контроль sCR1, який є загальним і майже абсолютним інгібітором системи комплементу

(Weisman H. et al., Science 249:146-151, 1990; Lazar H. et al., Circulation 100:1438-1442, 1999).

Потрібно зазначити, що контрольна сироватка від здорових суб'єктів також індукувала помірне утворення тромбів на клітинах HMEC-1. Автори винаходу не спостерігали відповідний інгібуючий ефект на індуковане контрольною сироваткою утворення тромбів при використанні або OMS646, або sCR1. Без зв'язку з конкретною теорією, вважається, що індуковані контрольною сироваткою тромби не залежать від комплементу, на що вказує дуже низьку кількість відкладення C5b-9, що спостерігається на клітинах HMEC-1, інкубованих з контрольною сироваткою (дивись приклад 41).

Висновок

Підводячи підсумок, що спостерігається антитромботичний ефект інгібуючого MASP-2 антитіла, такого як OMS646, судячи з усього, є набагато більш сильним, ніж можна було б чекати, виходячи з інгібуючого ефекту OMS646 на відкладення C5b-9, те, що спостерігається в даній експериментальній системі (як описано в прикладі 41 і показано на ФІГУРІ 56). Наприклад, як описано в публікації Gastoldi et al., Immunobiology 217:1129-1222 Abstract 48 (2012), озаглавленої "C5a/C5aR interaction mediates complement activation and thrombosis on endothelial cells in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)", було встановлено, що додавання анти-C5 антитіла, інгібуючого відкладення C5b-9 (зменшення 60 %), обмежувало утворення тромбів на HMEC-1 в порівнянній мірі (зменшення 60 %). Навпаки, інгібуюче MASP-2 антитіло (OMS646 в концентрації 100 мкг/мл) інгібувало відкладення C5b-9 з наступними середніми показниками (гостра фаза=зменшення 40 %; фаза ремісії=зменшення 54 %); і інгібувало утворення тромбів в значно більш високій мірі (гостра фаза=зменшення 57 %; фаза ремісії=зменшення 79 %). Для порівняння, OMS646 інгібувало відкладення комплементу в меншій мірі, в процентному вираженні, ніж позитивний контроль - інгібітор комплементу (sCR1 в концентрації 150 мкг/мл, інгібуювання відкладення C5b-9 у випадку гострої фази=зменшення 91 %; у випадку фази ремісії=зменшення 91 %), але було ефективним в рівній з позитивним контролем sCR1 мірі при інгібуванні утворення тромбів (sCR1 в концентрації 150 мкг/мл, у випадку гострої фази=зменшення 60 %; випадку фази ремісії=зменшення 85 %). Ці результати показують, що інгібуюче MASP-2 антитіло (наприклад, OMS646) є на здивування ефективним в інгібуванні утворення тромбів в сироватці, отриманій від суб'єктів з aHUS, як в гострій фазі, так і в фазі ремісії захворювання.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (ТМА), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення ТМА вибирають з групи, яка складається з гемолітичного уремічного синдрому (HUS), тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП) і атипового гемолітичного уремічного синдрому (aHUS). У одному варіанті здійснення ТМА являє собою aHUS. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з aHUS під час гострої фази захворювання. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з aHUS під час фази ремісії (тобто, суб'єкту, який відновився, або частково відновився, після епізоду гострої фази aHUS, при цьому на ремісію вказує, наприклад, підвищення кількості тромбоцитів і/або зниження сироваткових концентрацій LDH, наприклад, як описано в публікації Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібуює відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібуює відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою однокланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P і/або при цьому антитіло істотно не інгібуює класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібуює лектиновий шлях і істотно не інгібуює альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібуює лектиновий шлях і істотно не інгібуює класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібуює лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло інгібуює утворення тромбів в

сироватці суб'єкта, який страждає на ТТП, такий як aHUS (в гострій фазі або в фазі ремісії), на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 %, порівняно з необробленою сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібує MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на aHUS, на рівні, щонайменше на 20 відсотків, або більш (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %) перевищуючому інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці від пацієнта з aHUS в фазі ремісії на щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 %, порівняно з необробленою сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібує MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці від пацієнта з aHUS в фазі ремісії на рівні, щонайменше на 20 відсотків, або більш (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %) перевищуючому інгібуючий ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на aTMA, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67) i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У одному варіанті здійснення TMA вибирають з групи, яка складається з атипового гемолітичного уремичного синдрому (aHUS) (в гострій фазі або в фазі ремісії), HUS i ТТП. У одному варіанті здійснення суб'єкт має aHUS в гострій фазі. У одному варіанті здійснення суб'єкт має aHUS в фазі ремісії.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібує MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 i варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70. Конкуренцію між партнерами по зв'язуванню можна з легкістю аналізувати in vitro, наприклад, методом ELISA i/або шляхом приєднання до одного партнера по зв'язуванню репортерної молекули, яку можна виявляти в присутності іншого не маркірованого партнера(iv) по зв'язуванню, що дозволяє ідентифікувати конкретних партнерів по зв'язуванню, зв'язуючим одному i тому ж епітопу або епітопу, що перекривається. Таким чином, в цьому документі запропоноване специфічне антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить антигензв'язувальний сайт людського антитіла, яке конкурує з еталонним

антитілом OMS646 за зв'язування з людським MASP-2.

Приклад 43

У даному прикладі показано, що людське інгібуюче MASP-2 антитіло (OMS646) здатне інгібувати опосередковану плазмою пацієнта з TMA індукцію апоптозу в первинних людських мікроваскулярних ендотеліальних клітинах (MVEC), отриманих з шкіри.

Передумови/обґрунтування

Відомо, що патофізіологія TMA включає пошкодження ендотеліальних клітин, індуковане різними чинниками, за яким йде оклюзія дрібних судин (наприклад, дрібних артеріолів і капілярів) пробками з тромбоцитів і/або фібриновими тромбами (Hirt-Minkowsk P. et al., *Nephron Clin Pract* 114:c219-c235, 2010; Goldberg R.J. et al., *Am J Kidney Dis* 56(6):1168-1174, 2010). Показано, що MVEC піддаються апоптотичному пошкодженню *in vitro* під впливом плазми від пацієнтів з TMA-зв'язаними захворюваннями (дивись Stefanescu et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008; Mitra D. et al., *Blood* 89:1224-1234, 1997). Апоптотичні пошкодження, пов'язані з TMA, були задокументовані в MVEC, отриманих з біопсійних зразків тканин (шкіри, кістки, кісткового мозку, селезінки, нирки, клубової кишки) таких пацієнтів. Також показано, що апоптотичні пошкодження MVEC приводять до зниження рівнів мембранозв'язаних регуляторних білків комплементу в MVEC (дивись, наприклад, Mold & Morris, *Immunology* 102:359-364, 2001; Christmas et al., *Immunology* 119:522, 2006).

Вважається, що цикл позитивного зворотного зв'язку з участю термінальних компонентів комплементу залучений в патофізіологію TMA, включаючи атиповий гемолітичний уремичний синдром (aHUS) і TMA, зв'язаний з катастрофічним антифосфоліпідним синдромом (CAPS), хворобою Дегоса, а також TMA в результаті раку, протираковою хіміотерапії, аутоімунітета і трансплантації, кожне з цих станів, як відомо або вважається, відповідає на анти-C5 терапію з використанням мАт екулізумабу (Chapin J. et al., *Brit. J. Hematol* 157:772-774, 2012; Tsai et al., *Br J Haematol* 162(4):558-559, 2013; Magro C. M. et al., *Journal of Rare Diseases* 8:185, 2013).

Проводили наступний експеримент для аналізу здатності людського інгібуючого MASP-2 антитіла (OMS646) блокувати опосередковану плазмою пацієнта з TMA індукцію апоптозу в первинних людських шкіряних MVEC в зразках плазми, отриманих від пацієнтів, які страждають на aHUS, пов'язаної з дефіцитом ADAMTS-13 тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП), CAPS і системної хвороби Дегоса, а також TMA в результаті раку, трансплантації, аутоімунного захворювання і хіміотерапії.

Методи

Проводили *in vitro* тест для аналізу здатності інгібуючого MASP-2 антитіла (OMS646) блокувати опосередковану плазмою пацієнта з TMA індукцію апоптозу в первинних людських MVEC з шкіри, як описано в публікації Stefanescu R. et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008, зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання. Зразки плазми, що використовуються в даному аналізі, були отримані з колекції зразків від здорових контрольних суб'єктів і від індивідів з тромботичними мікроангіопатіями або в гострій фазі, або в період видужання. Наявність мікроангіопатії у пацієнтів з TMA оцінювали шляхом виявлення шизоцитів в мазку периферичної крові. Крім того, ТТП була діагностована, як описано в публікації Stefanescu R. et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008.

Культура ендотеліальних клітин (EC)

Як описано в Stefanescu et al., первинні людські MVEC з шкіри купували у компанії ScienCell Research Labs (San Diego, CA). MVEC експресували CD34 аж до 5 і 6 пересівів (*Blood* 89:1224-1234, 1997). MVEC підтримували в полістирольних флаконах, покритих 0,1 % розчином желатину у воді, в середовищі ECM1001 (ScienCell Research Labs), що містить добавки для зростання ендотеліальних клітин, пеніцилін, стрептоміцин і 15 % ембріональних бичачих сироватки. Все MVEC використовували на стадії 2-6 пересіви. Субкультивування включало обробку протягом 5-10 хвилин 0,25 % розчином трипсин-ЕДТА.

Аналіз апоптозу

Репрезентативні первинні людські MVEC з шкіри, які, як відомо, схильні індукованому ТТП/HUS плазмою апоптозу, промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і висівали в камери 12-ямкових планшетів, покритих 0,1 % розчином желатину у воді, в концентрації $0,15 \times 10^6$ життєздатних клітин/мл. Висіяні клітини MVEC залишали без підгодівлі в повному середовищі на 24 години, потім піддавали впливу зразків плазми пацієнтів з TMA, або плазми здорових донорів, в різних концентраціях (від 2 % до 20 %, об./об.) протягом 18 годин в присутності або при відсутності анти-MASP-2 мАт OMS646 (150 мкг/мл), потім клітини збирали шляхом обробки трипсином. Кожний зразок від пацієнта з TMA аналізували в двох повторях. Міра опосередкованого плазмою апоптозу оцінювали з використанням фарбування пропідію йодидом (PI); $>5 \times 10^3$ клітин аналізували в цитофлюорографі, і піки A0 визначали за допомогою

комп'ютерної програми (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Також проводили кількісне визначення пов'язаних з цитоплазматичними гістонами фрагментів ДНК з клітинних лізатів методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) відповідно до інструкцій виробника (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

5 Результати

Результати аналізу апоптозу MVEC, індукованого плазмою пацієнтів з ТМА, в присутності анти-MASP-2 МАТ (OMS646) наведені нижче в ТАБЛИЦІ 25.

Таблиця 25:

ПЛАЗМА ПАЦІЄНТІВ З ТМА, ПРОТЕСТОВАНА НА ПЕРВИННИХ ЛЮДСЬКИХ ШКІРЯНИХ MVEC В ПРИСУТНОСТІ АНТИ-MASP-2 МАТ (OMS646)

Суб'єкт №	Вік/стать	Клінічний діагноз (ТМА) і інші стани	MAASP-2 нг/мл	Діагноз на основі Cre/LDH	C5a	sC5-b9	Активність ADAMS	Діагноз на основі активності ADAMS	Захист за рахунок OMS646
№ 2	41/ж	TTP	174	TTP	34,42	772	30 %	aHUS	відповідає
№ 3	52/ж	TTP	150	TTP	48,32	1399	70 %	aHUS	не відповідає
№ 4	20/м	TTP	224	TTP	36,9	1187	<10 %	TTP	відповідає
№ 10	60/ж	TTP	175,4	TTP	49,5	4406	64 %	aHUS	не відповідає
№ 11	59/ж	TTP	144,9	TTP	40,3	1352	<10 %	TTP	не відповідає
№ 13	49/ж	HUS, рак, TTP	142,8	TTP	48,6	3843	86 %	aHUS	не відповідає
№ 42	27/м	TTP	341,5	TTP	100,0	5332	<5 %	TTP	не відповідає
№ 46	25/ж	TTP, Хвороба Дегоса, SLE	225,11	TTP	53,9	3426	H/O	H/O	відповідає
№ 48	53/ж	TTP, SLE, нефрит с/п трансплантації нирки	788,5	aHUS	31,2	1066	66 %	aHUS	відповідає
№ 49	64/ж	TTP, APLA, CVA	494,5		35,4	2100	H/O	H/O	відповідає
№ 51	25/ж	aHUS, APLA	313,1	TTP	26,8	1595	23 %	aHUS	відповідає
№ 52	56/ж	aHUS, SLE	333,1	TTP	18,9	1103	97 %	aHUS	не відповідає
№ 53	56/ж	aHUS, ремісія	189,9	TTP, ремісія	28,69	344	74 %	aHUS	не відповідає

Скорочення, що використовуються в ТАБЛИЦІ 25:

"APLA" = антифосфоліпідні антитіла, зв'язані з катастрофічним антифосфоліпідним синдромом (CAPS).

"SLE" = системний червоний вовчак

"CVA" = порушення мозкового кровообігу (інсульт)

10

Відповідно до результатів, наведених в публікації Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008, значний апоптоз спостерігали в первинних шкіряних MVEC в присутності тринадцяти зразків плазми пацієнтів з ТМА при відсутності анти-MASP-2 антитіла. Зразки контрольної плазми від здорових людей були протестовані паралельно і не індукували апоптоз в MVEC (дані

не представлені). Як показано в ТАБЛИЦІ 25, інгібуюче MASP-2 мАт (OMS646) інгібувало опосередковану плазмою пацієнтів з ТМА індукцію апоптозу в первинних MVEC ("що відповідають" в ТАБЛИЦІ 25) в 6 з 13 протестованих зразків плазми пацієнтів (46 %). Зокрема, потрібно зазначити, що інгібуюче MASP-2 мАт (OMS646) інгібувало апоптоз в плазмі, отриманій від пацієнтів, які страждають на aHUS, ТТП, хвороби Дегоса, SLE, наслідків трансплантації і APLA (CAPS). Що стосується семи зразків від пацієнтів, протестованих в даному аналізі, в яких анти-MASP-2 мАт не блокувало апоптоз ("що не відповідають" в ТАБЛИЦІ 25), потрібно зазначити, що апоптоз може бути індукований декількома шляхами, не всі з яких залежать від комплементу. Наприклад, як відзначено в публікації Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008, апоптоз в аналізі ЕС залежить від базового стану активації ЕС, на який впливають чинники плазми, здатні грати роль у визначенні рівня пошкодження, необхідного для індукції апоптозу. Як також відзначено в публікації Stefanescu R. et al., додаткові чинники, здатні модулювати апоптоз, можуть бути присутнім в плазмі пацієнтів з ТМА, такі як цитокіни і різні компоненти системи комплементу. Таким чином, внаслідок цих ускладнюючих факторів, недивно, що анти-MASP-2 антитіло не надає блокуючу дію у всіх зразках плазми, в яких був відмічений ТМА, що індукується плазмою апоптоз.

Також в цьому відношенні потрібно зазначити, що аналогічний аналіз проводили з використанням в тесті індукованого ТМА плазмою апоптозу анти-C5 антитіла екулізумабу, і були отримані дуже схожі результати (дивись Chapin et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract № 3342, 120: 2012). Клінічна ефективність екулізумабу, дуже успішного комерційного продукту, очевидно, є більшою, ніж ефективність, продемонстрована в цьому аналізі, це вказує на те, що в даній *in vitro* моделі може бути недооцінений клінічний потенціал інгібуючих комплемент лікарських засобів.

Отримані результати показують, що інгібуюче MASP-2 антитіло, таке як OMS646, є ефективним в інгібуванні індукованого ТМА плазмою апоптозу в плазмі, отриманій від пацієнтів, які страждають на ТМА, такий як aHUS, ТТП, хвороба Дегоса, SLE, наслідки трансплантації і APLA (CAPS). Також відомо, що ендотеліальні пошкодження і апоптоз відіграють ключову роль в патології ТМА, таких як ідіопатична ТТП і спорадичний HUS (Kim et al., Microvascular Research vol 62(2):83-93, 2001). Як описано в публікації Dang et al., апоптоз був продемонстрований в червоній пульпі селезінки пацієнтів з ТТП, але не у здорових контрольних суб'єктів (Dang et al., Blood 93(4):1264-1270, 1999). Ознаки апоптозу також були відмічені в гломерулярних клітинах нирок, що походять з MVEC, у пацієнта з HUS (Arends M. J. et al., Hum Pathol 20:89, 1989). Таким чином, очікується, що введення інгібуючого MASP-2 засобу, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло (наприклад, OMS646), буде ефективним методом лікування пацієнтів, які страждають на ТМА, такий як aHUS, ТТП або інші мікроангіопатичні захворювання, наприклад, інші ТМА, включаючи CAPS, системну хворобу Дегоса, а також ТМА в результаті раку; ТМА внаслідок хіміотерапії або ТМА внаслідок трансплантації.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування пошкодження ендотеліальних клітин і/або апоптозу ендотеліальних клітин, і/або утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на, або має ризик розвитку, тромботичної мікроангіопатії (ТМА), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У одному варіанті здійснення ТМА вибирають з групи, яка складається з атипового гемолітичного уремичного синдрому (aHUS), тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП) і гемолітичного уремичного синдрому (HUS). У одному варіанті здійснення ТМА являє собою aHUS. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з aHUS під час гострої фази захворювання. У одному варіанті здійснення композицію вводять пацієнту з aHUS під час фази ремісії (тобто, суб'єкту, який відновився, або частково відновився, після епізоду гострої фази aHUS, при цьому на ремісію вказує, наприклад, підвищення кількості тромбоцитів і/або зниження сироваткових концентрацій LDH, наприклад, як описано в публікації Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання).

У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, ТМА, яка являє собою (i) ТМА в результаті раку; (ii) ТМА внаслідок хіміотерапії або (iii) ТМА внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, такої як трансплантація нирки, або трансплантації алогенних гемопоетичних стовбурових клітин). У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, синдрому Апшо-Шульмана (USS). У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, хвороби Дегоса. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS).

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-

2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P і/або при цьому антитіло істотно не інгібує класичний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує альтернативний шлях. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях або альтернативний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, при цьому не торкаючись класичного і альтернативного шляхів комплекменту).

У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло інгібує індукований плазмою апоптоз MVEC в сироватці суб'єкта, який страждає на TMA, такий як aHUS (в гострій фазі або в фазі ремісії), гемолітичний уремичний синдром (HUS), тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП), TMA в результаті раку; TMA внаслідок хіміотерапії; TMA внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, такої як трансплантація нирки, або трансплантації аlogenних гемопоетичних стовбурових клітин), або в сироватці суб'єкта, який страждає на синдрому Апшо-Шульмана (USS), або в сироватці суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, або у суб'єкта, який страждає на катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS), при цьому індукований плазмою апоптоз MVEC інгібується на щонайменше 5 %, наприклад, щонайменше 10 %, наприклад, щонайменше 20 %, наприклад, щонайменше 30 %, наприклад, щонайменше 40 %, наприклад, щонайменше 50 %, наприклад, щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 85 %, наприклад, щонайменше 90 %, наприклад, щонайменше 95 %, аж до 99 %, порівняно з необробленою сироваткою. У деяких варіантах здійснення інгібує MASP-2 антитіло інгібує утворення тромбів в сироватці суб'єкта, який страждає на TMA (наприклад, такий як aHUS (в гострій фазі або в фазі ремісії), гемолітичний уремичний синдром (HUS), тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП), TMA в результаті раку; TMA внаслідок хіміотерапії; TMA внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, такої як трансплантація нирки, або трансплантації аlogenних гемопоетичних стовбурових клітин), або в сироватці суб'єкта, який страждає на синдрому Апшо-Шульмана (USS), або в сироватці суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, або у суб'єкта, який страждає на катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS)), на рівні, щонайменше на 20 відсотків або більш (наприклад, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %) перевищуючому інгібує ефект на відкладення C5b-9 в сироватці.

У одному варіанті здійснення інгібує MASP-2 антитіло вводять суб'єкту способом доставки через внутрішньовенний катетер або інший катетер.

У одному варіанті здійснення винахід стосується способу інгібування утворення тромбів у суб'єкта, який страждає на TMA (такий як aHUS (в гострій фазі або в фазі ремісії), гемолітичний уремичний синдром (HUS), тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП), TMA в результаті раку; TMA внаслідок хіміотерапії; TMA внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, такої як трансплантація нирки, або трансплантації аlogenних гемопоетичних стовбурових клітин), або в сироватці суб'єкта, який страждає на синдрому Апшо-Шульмана (USS), або в сироватці суб'єкта, який страждає на хворобу Дегоса, або у суб'єкта, який страждає на катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS)), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібує MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-102 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше

96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на ТМА, вибраної з групи, яка складається з ТМА в результаті раку; ТМА внаслідок хіміотерапії; ТМА внаслідок трансплантації (наприклад, трансплантації органу, такої як трансплантація нирки, або трансплантації алогенних гемопоетичних стовбурових клітин), синдрому Апшо-Шульмана (USS), хвороби Дегоса і катастрофічного антифосфоліпідного синдрому (CAPS).

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Приклад 44

У даному прикладі описані початкові результати поточного клінічного випробування фази 2 за оцінкою безпеки і клінічною ефективністю повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла у дорослих пацієнтів з тромботичними мікроангіопатіями (ТМА).

Передумови

ТМА являють собою сімейство рідких, виснажуючих і загрозливих життю захворювань, що характеризуються наявністю надмірної кількості тромбів (згустків) - агрегатів тромбоцитів - в мікросудинній системі органів тіла, переважно в бруньках і головному мозку.

Методи

Першу стадію відкритого клінічного випробування фази 2 проводили з участю суб'єктів, які страждають на первинного атипового гемолітичного уремичного синдрому (аHUS), стійкого до плазмотерапії аHUS і тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП). У клінічному випробуванні фази 2 не використовували групу плацебо, враховуючи загрозливий життю характер захворювання.

Суб'єкти мали вік 18 років при скринінгу і були включені в дане дослідження тільки в тому випадку, якщо вони мали діагноз однієї з наступних ТМА:

1) Первинний аHUS, діагностований клінічно, з активністю ADAMTS-13 $>10\%$ в плазмі. Пацієнти можуть бути включені в дослідження при наявності або відсутності документованої мутації компонентів комплементу або анти-CFH антитіл. Пацієнтів розділяють на категорії на основі їх відповіді на плазмотерапію (плазмаферез або інфузію плазми):

- Пацієнти з аHUS, стійким до плазмотерапії, для цілей даного дослідження відповідають всім з наступних критеріїв:

(а) при скринінгу кількість тромбоцитів $<150000/\text{мкл}$, незважаючи на щонайменше чотири сеанси плазмотерапії до проведення скринінгу;

(b) ознаки мікроангіопатичного гемолізу (наявність шизоцитів, сироватковий рівень лактатдегідрогенази (LDH) $>$ верхньої межі норми (ВМН), гаптоглобін $<$ НМН); і

(с) сироватковий рівень креатиніну $>$ ВМН.

- Пацієнти з тим, що хронічним відповідає на плазмотерапію (чутливим до плазмотерапії) аHUS повинні отримувати щонайменше один раз на тиждень плазмотерапію протягом чотирьох тижнів до отримання першої дози OMS646, з сироватковим рівнем креатиніну $>$ ВМН.

2) ТТП, що визначається по наявності однієї з наступних ознак:

- кількість тромбоцитів $<150000/\text{мкл}$;

- ознаки мікроангіопатичного гемолізу (наявність шизоцитів, сироватковий рівень LDH $>$ ВМН, або гаптоглобіну $<$ НМН); і

- активність ADAMTS-13 $\leq 10\%$ під час поточного епізоду ТТП або історично.

Примітка: Суб'єктів виключали з дослідження, якщо вони отримували терапію екулізумабом в межах трьох місяців до скринінгу. Критерії для пацієнтів, що кваліфікуються як несприйнятливі до плазмотерапії, використовували для цілей визначення придатності для участі в даному

дослідженні. У наступних аспектах винаходу пацієнт, не сприйнятливий до плазмотерапії, якого ставало лікувати інгібітором MASP-2, раніше отримував плазмотерапію щонайменше один раз, і після такого сеансу плазмотерапії все ще мав один або більш клінічних ознак aHUS, які не були адекватно зменшені або усунені в результаті такої плазмотерапії.

Моноклональне антитіло, що використовується в даному дослідженні, OMS646, являє собою повністю людське IgG4 мАт, направлене проти людського MASP-2. Як продемонстровано в прикладі 40, OMS646 авидно зв'язує рекомбінантний MASP-2 (позірна рівноважна константа дисоціації в діапазоні 100 пМ) і виявляє більш ніж 5000-кратну вибірковість відносно гомологічних білків C1s, C1r і MASP-1. У функціональних аналізах OMS646 інгібує лектиновий шлях комплементу у людини з активністю в наномолярному діапазоні (концентрація, що приводить до 50 % інгібування [IC₅₀], становить приблизно 3 нМ), але не впливає істотно на класичний шлях комплементу. Введення OMS646 або внутрішньовенною (в/в), або підшкірною (п/ш), ін'єкцією мишам, приматам і людині приводило до високих концентрацій в плазмі, які були пов'язані з придушенням лектинового шляху активації в аналізах ex vivo. Як додатково описано в прикладі 42, введення OMS646 приводило до зменшення відкладення C5b-9 і утворення тромбів в in vitro моделях TMA, і утворення тромбів в мишачій моделі TMA, таким чином демонструючи, що OMS646 можна використовувати в терапії.

У даному дослідженні лікарська субстанція OMS646 була надана в концентрації 100 мг/мл, її додатково розбавляли для в/в введення. Відповідний розрахунковий об'єм ін'єкційного розчину OMS646 з концентрацією 100 мг/мл відбирали з флакона за допомогою шприца для приготування дози. Рідину з інфузійного мішка вводили протягом чотирьох годин після приготування.

На стадії 1 дослідження OMS646 вводили в режимі ескалації дози групам, кожна з яких включала трьох суб'єктів. Кожний суб'єкт на стадії 1 отримував чотири щотижневих дози OMS646, як описано нижче в ТАБЛИЦІ 26.

Таблиця 26:

СХЕМА ДОЗУВАННЯ ДЛЯ СТАДІЇ 1

Стадія, Група	Число суб'єктів	Доза OMS646 (мг/кг)
1, Група 1	3	0,675, щотижнево x 4
1, Група 2	3	2,0, щотижнево x 4
1, Група 3	3	4,0, щотижнево x 4

Схема дизайну дослідження на стадії 1



Розбавлений досліджуваний препарат вводили внутрішньовенної інфузією протягом 30-хвилинного періоду часу.

Основні критерії оцінки

Комбінованими основними критеріями оцінки були:

- Безпека на основі результатів визначення НЯ, показників життєво важливих функцій, ЕКГ і клінічних лабораторних аналізів

- Клінічна ефективність на основі зміни кількості тромбоцитів

Вторинні критерії оцінки

Вторинними критеріями оцінки були:

- Клінічна активність TMA

- Сироватковий рівень LDH

- Сироватковий рівень гаптоглобіну

- Рівень гемоглобіну

- Сироватковий рівень креатиніну

- Зв'язані з TMA симптоми

- Необхідність плазмотерапії (плазмаферезу або інфузії плазми)

Необхідність діалізу

Допустимі супутні види лікування

- Стійкий до плазмотерапії aHUS - плазмотерапія в процесі лікування OMS646 була допустима, якщо дослідник вважав її необхідною з медичної точки зору.

- Хронічний відповідаючий на плазмотерапію aHUS - дослідники були повідомлені, що плазмотерапію потрібно продовжувати до появи ознак полегшення ТМА, наприклад, збільшення кількості тромбоцитів, зменшення рівня LDH, збільшення рівня гаптоглобіну, збільшення рівня гемоглобіну, зменшення рівня креатиніну, після чого дослідникам було рекомендовано припиняти плазмотерапію і провести моніторинг параметрів ТМА для визначення того, чи можна припиняти плазмотерапію.

- ТТП - плазмотерапія була допустима, якщо дослідник вважав її необхідною з медичної точки зору.

- Дослідники були повідомлені, що діаліз нирок потрібно провести відповідно до стандарту надання медичної допомоги.

- Екулізумаб не вводили протягом дослідження.

Результати

Перша група суб'єктів складалася з трьох пацієнтів з aHUS, що отримували саму низьку дозу OMS646. Поліпшення спостерігали для всіх маркерів захворювання ТМА у всіх пацієнтів в даній групі, що досліджується. Кількість тромбоцитів, сироваткові рівні лактатдегідрогенази (LDH) і сироваткові рівні гаптоглобіну вимірювали як маркери активності захворювання. При порівнянні з початковими рівнями кількість тромбоцитів поліпшувалася у всіх пацієнтів. Сироваткові рівні LDH залишалися нормальними у одного пацієнта, меншали майже до нормального діапазону у іншого, і залишалися підвищеними у третього. Рівень гаптоглобіну поліпшувався у двох пацієнтів, у одного нормалізувався. Рівні креатиніну у одного пацієнта з незалежною від діалізу функцією нирок також поліпшилися.

Як було заплановано, в даному клінічному випробуванні три пацієнти отримували лікування у другій групі зі середньою дозою. Два пацієнти мали стійкий до плазмотерапії aHUS, і один пацієнт мав тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру (ТТП). Обидва пацієнти з aHUS отримували нирковий діаліз до, і в процесі, включення в дослідження. У другій групі, або групі зі середньою дозою, у двох пацієнтів з стійким до плазмотерапії aHUS спостерігали:

- збільшення на 47 % середньої кількості тромбоцитів, внаслідок чого у обох пацієнтів кількості досягли нормального діапазону;

- зменшення на 86 % середньої кількості шизоцитів, при цьому у одного пацієнта шизоцити зникли;

- збільшення на 71 % середнього рівня гаптоглобіну, при цьому у обох пацієнтів рівень досяг нормального діапазону в процесі лікування, у одного рівень опустився трохи нижче за норму через тиждень після останньої дози;

- зменшення на 5 % середніх рівнів LDH, при цьому у обох пацієнтів рівні злегка перевищували нормальний діапазон.

Пацієнту з ТТП в групі зі середньою дозою був потрібен періодична інфузія плазми до включення в дослідження. Лабораторні параметри не показували стійке поліпшення, однак пацієнту не був потрібен плазмотерапія ні в процесі лікування OMS646, ні після завершення лікування, до цього часу.

Лікарський засіб добре переносили всі пацієнти протягом всього періоду лікування. Виходячи з позитивних результатів у другій, або середньої дози, групі, було почато лікування в третій, або високої дози, групі, і пацієнт з aHUS вже завершив період лікування в дослідженні. Дані, наведені для всіх пацієнтів, включають показники через тиждень після останньої дози.

Перший пацієнт в третій (високої дози) групі - пацієнт з стійким до плазмотерапії aHUS з додатковими ускладненнями, включаючи гепатит С, кріоглобулінемію і лімфому - також завершив лікування OMS646. До лікування OMS646 пацієнту був необхідний регулярний діаліз. Протягом лікування і після завершення курсу OMS646, до цього часу, пацієнту не потрібно діаліз. Гематологічні параметри і параметри ниркової функції показали:

- поліпшення на 63 % кількості тромбоцитів, повернення до нормальних рівнів;

- зменшення на 100 % кількості шизоцитів;

- рівні гаптоглобіну збільшилися від рівнів, що не піддаються визначенню і нормалізувалися;

- зменшення на 43 % рівня LDH, в результаті рівень лише злегка вище за норму;

- зменшення на 24 % рівнів креатиніну.

Так само, як і в першій і другій групах, лікарський засіб добре переносився.

Основним критерієм оцінки в цьому відкритому клінічному випробуванні фази 2 є зміна кількості тромбоцитів. Кількість тромбоцитів у всіх трьох пацієнтів з aHUS в групах середньої і

високої дози (у двох в групі середньої дози і у одного в групі високої дози) повернулася до норми, зі статистично значущим середнім збільшенням від початкового рівня, що складає приблизно 68000 тромбоцитів/мл ($p=0,0055$).

5 Підводячи підсумок, отримані до цього часу дані в цьому клінічному випробуванні фази 2 показують ефективність OMS646 у пацієнтів з первинним aHUS, стійким до плазмотерапії aHUS і у пацієнтів з ТТП.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта, який страждає на стійкого до плазмотерапії aHUS, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає етап ідентифікації суб'єкта, який страждає на стійкого до плазмотерапії aHUS, до введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло.

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, пов'язаного з aHUS, наприклад, збільшення кількості тромбоцитів, зменшення рівня LDH, збільшення рівня гаптоглобіну, збільшення рівня гемоглобіну і/або зменшення рівня креатиніну.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на стійкого до плазмотерапії aHUS, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів), з подальшим введенням інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протяжністю щонайменше два тижні або довше). У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмотерапії. У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують в поєднанні з плазмотерапією.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на стійкого до плазмотерапії aHUS, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або, переважно, підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, кожні два тижні. Інгібуюче MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на стійкого до плазмотерапії aHUS, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 %).

99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способів включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способів включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Приклад 45

У даному прикладі описані додаткові результати, отримані в поточному клінічному випробуванні фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла у дорослих пацієнтів з тромботичними мікроангіопатіями (ТМА), описаному в прикладі 44.

Передумови

Як описано в прикладі 44, ТМА являють собою сімейство рідких, виснажуючих і загрозливих життю захворювань, що характеризуються наявністю надмірної кількості тромбів (згустків) - агрегатів тромбоцитів - в мікросудинній системі органів тіла, переважно в бруньках і головному мозку. Як описано в цьому документі, пов'язана з трансплантатом ТМА (ТА-ТМА) є руйнівним синдромом, який може розвиватися у трансплантат пацієнтів, що отримали, наприклад, у реципієнтів трансплантата гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT). У даному прикладі описані початкові результати клінічного випробування фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла у пацієнтів, які страждають на пов'язаній з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин ТМА.

Методи

Як описано в прикладі 44, випробування фази 2 для вивчення ТМА складається з стадії введення трьох рівнів доз, з подальшою стадією введення фіксованої дози інгібуючого MASP-2 антитіла OMS646. Як також описано в прикладі 44, позитивні результати були отримані для пацієнтів з aHUS і одного пацієнта з ТТП, з послідовним і надійним поліпшенням показників ефективності. Як і в групі низької дози, OMS646 добре переносили всі пацієнти в групах середньої і високої дози протягом всього періоду лікування. Доклінічні дослідження токсичності були проведені і продемонстрували відсутність проблем з безпекою, що дозволило провести періодичне введення доз в клінічних дослідженнях.

Як описано в прикладі 44, дані по OMS646 були отримані в клінічному випробуванні фази 2 для вивчення ТМА з участю пацієнтів з aHUS і ТТП. До теперішнього часу введення доз було завершено для додаткового пацієнта з ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, в групі високої дози з використанням способів, описаних в прикладі 44. Цей пацієнт мав в анамнезі лімфому, в зв'язку з якою він отримав трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин. Його стан після трансплантації був ускладнений цілим рядом загрозливих життю захворювань, включаючи ТМА, внаслідок якої йому було необхідно переливання тромбоцитарної маси. Незважаючи на переливання, у нього зберігалася ТМА, пов'язана з трансплантатом стовбурових клітин, і він був включений в дослідження фази 2 з введенням OMS646.

Результати

Після чотиритижневий періоду дозування (група високої дози), як описано в прикладі 44, у пацієнта з ТМА, пов'язаної з трансплантатом стовбурових клітин, спостерігали:

- збільшення в чотири рази кількості тромбоцитів, що привело до кількості тромбоцитів, що перевищує 100000;
- рівень гаптоглобіну збільшився більш ніж в два рази і став нормальним;
- рівень в плазмі лактатдегідрогенази, показника пошкодження кровоносних судин, поменшав на 35 %, але був все ще вище за норму;
- кількість шизоцитів зберігалася на рівні одного.

Протягом всього періоду введення доз OMS646 і після завершення лікування OMS646 пацієнт не потребував переливання тромбоцитарної маси або плазмаферезі.

Підводячи підсумок, дані, отримані до цього часу в цьому клінічному випробуванні фази 2 (як описано в прикладі 44 і в даному прикладі), демонструють ефективність OMS646 у пацієнтів з первинним aHUS, стійким до плазмотерапії aHUS, ТТП, а також у пацієнта з ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу. У
 5 одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до лікування переливанням тромбоцитарної маси і/або плазмаферезом. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, страждаючої від ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до лікування переливанням тромбоцитарної маси і/або
 10 плазмаферезом, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу.

Відповідно до будь-якого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло
 15 зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при
 20 цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, асоційованого з ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, наприклад, збільшення кількості тромбоцитів (наприклад, збільшення щонайменше в два, щонайменше в три, щонайменше в чотири рази кількості тромбоцитів до початку лікування), підвищення рівня
 25 гаптоглобіну і/або зниження рівня лактатдегідрогенази.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів), з подальшим введенням інгібуючого
 35 MASP-2 антитіла суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протяжністю щонайменше два тижні або довше). У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмотерапії. У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують в поєднанні з плазмотерапією.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або, переважно, підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, кожні два тижні. Інгібуюче
 40 MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на ТМА, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків
 50 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в
 55 SEQ ID NO: 70, або (II) його варіанту, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності
 60 послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67).

щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способу включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення способу включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

Приклад 46

У даному прикладі описані додаткові результати, отримані в поточному клінічному випробуванні фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла у дорослих пацієнтів з тромботичними мікроангіопатіями (ТМА), описаному в прикладах 44 і 45.

Передумови

Як описано в прикладі 45, пов'язана з трансплантатом ТМА (ТА-ТМА) є руйнівним синдромом, який може розвиватися у пацієнтів, що отримали трансплантат, наприклад, у реципієнтів трансплантата гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT). Пов'язана з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин ТМА (HSCT-ТМА) є загрозливим життю ускладненням, яке ініціюється пошкодженням ендотелію. Нирка є органом, який вражається частіше за все, хоча HSCT-ТМА може бути мультисистемним захворюванням, що також торкається легенів, кишечника, серця і головного мозку. Наявність навіть слабко вираженої ТМА пов'язано з довготривалою нирковою недостатністю. Розвиток пов'язаної з алогенною HSCT ТМА розрізняється по частоті випадків залежно від різних діагностичних критеріїв і кондиціонування, а також від режимів профілактики реакції трансплантат проти хазяїна, при яких що найчастіше використовуються лікарськими засобами є інгібітори кальційнейрину (Ho VT et al., Biol Blood Marrow Transplant, 11(8):571-5, 2005). Зміна режиму введення імуносупресивних інгібіторів кальційнейрину може приводити до ослаблення ТМА у деяких пацієнтів в межах декількох тижнів після зменшення або припинення введення інгібіторів кальційнейрину.

ТМА є потенційно загрозливим життю ускладненням HSCT, і її в цей час контролюють головним чином за рахунок зменшення стимулюючих факторів, в тому числі за рахунок уникнення імунодепресантів (наприклад, інгібіторів кальційнейрину) і лікування поточних інфекцій, а також за рахунок підтримуючих заходів, таких як гемодіаліз. Хоч багато які пацієнти з HSCT-ТМА добре відповідають на зменшення або припинення введення імунодепресантів, існує підгрупа пацієнтів, які мають стійку HSCT-ТМА, незважаючи на заходи консервативного лікування (тобто, ТМА не відповідає на зменшення або припинення введення імунодепресантів). Пацієнти, які не відповідають на ці консервативні методи лікування, мають поганий прогност. Обмін плазми є неефективним, і ніякі інші методи лікування не схвалені.

У Прикладі 45 описані початкові позитивні результати клінічного випробування фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла (OMS646) у пацієнтів, які страждають на стійку пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин ТМА (HSCT-ТМА). У даному прикладі описані додаткові результати поточного клінічного випробування фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності OMS646 у трьох додаткових суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-ТМА, стійкої до консервативних методів лікування.

Методи

Як описано в прикладі 44, випробування фази 2 для вивчення ТМА складається з стадії введення трьох рівнів доз, з подальшою стадією введення фіксованої дози інгібуючого MASP-2 антитіла OMS646. OMS646 добре переносили всі пацієнти в групах низької, середньої і високої дози протягом всього періоду лікування. Доклінічні дослідження токсичності були завершені і показали відсутність проблем з безпекою, що дозволяє періодично вводити дози в клінічних випробуваннях.

У клінічному випробуванні фази 2 для вивчення ТМА беруть участь суб'єкти, страждаючі від стійкою пов'язаною з HSCT ТМА, стійкої до консервативних методів лікування, яку визначають для цілей даного дослідження, як що характеризується всіма з наступних ознак щонайменше через два тижні після зменшення або припинення введення імунодепресанта (наприклад, введення інгібіторів кальційнейрину), або щонайменше через 30 днів після трансплантації:

- Тромбоцитопенія (кількість тромбоцитів $<150000/\text{мкл}$); і
- Ознаки мікроангіопатичної гемолітичної анемії (наявність шизоцитів, сироватковий рівень лактатдегідрогенази (LDH) $>$ верхньої межі норми (ВМН) або рівень гаптоглобіну $<$ нижньої межі норми (НМН).)

5 Допустимі супутні методи лікування для пов'язаної з HSCT TMA

- Плазмотерапія при лікуванні OMS646 допустима, якщо дослідник вважає її необхідною з медичної точки зору. Пацієнти, які одержують плазмотерапію, можуть отримувати додаткові половини доз OMS646.

10 - Дослідники були повідомлені, що діаліз нирок потрібно провести у відповідності зі стандартом надання медичною допомоги.

- Екулізумаб не вводили протягом дослідження.

У поточне дослідження TMA включені суб'єкти, страждаючі від стійкої HSCT-TMA, яка стійка до стандартних методів лікування (тобто, стійка TMA щонайменше через два тижні після зменшення або припинення введення інгібіторів кальційнейрину).

15 Як описано в прикладі 45, дозування було завершено для пацієнта, який страждає на стійкій HSCT-TMA (пацієнт № 1) в групі високої дози (4 мг/кг OMS646, в/в введення один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів) з використанням способів, описаних в прикладі 44.

До теперішнього часу дозування завершено ще для 4 пацієнтів, які страждають на стійку HSCT-TMA, як описано нижче.

20 Пацієнт № 1 (описаний в прикладі 44) отримував лікування OMS646 протягом чотирьох тижнів (4 мг/кг в/в один раз на тиждень);

Пацієнти № 2 і № 3 отримували лікування OMS646 протягом восьми тижнів (4 мг/кг в/в один раз на тиждень);

25 Пацієнти № 4 і № 5 отримували лікування OMS646 (4 мг/кг в/в один раз на тиждень) протягом двох і трьох тижнів, відповідно. Пацієнти № 4 і № 5 припинили участь в дослідженні через дві і три тижні, відповідно, не відповідали на лікування і їх стан погіршилося. Потрібно зазначити, що один з цих пацієнтів мав значно підвищений рівень креатиніну в момент включення в дослідження.

Результати

30 У дане дослідження були включені п'ять пацієнтів зі стійкої HSCT-TMA. Всі суб'єкти були дорослими і отримали HSCT в зв'язку зі злоякісними хворобами крові. На ФІГУРАХ 58, 59 і 60 показана зміна від базового рівня показників TMA після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом OMS646. На цих ФІГУРАХ наведені дані для всіх трьох пацієнтів, два з яких припинили участь в дослідженні через 2-3 тижні, у одного згодом стався рецидив, а інший отримував паліативне лікування. Як показано на ФІГУРАХ 58, 59 і 60, останнє можливе лікування було проведене на тиждень 7.

40 На ФІГУРІ 58 наведений графік, що показує середню зміну кількості тромбоцитів від початкового рівня з плином часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, тромботичної мікроангіопатії (HSCT-TMA), після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

На ФІГУРІ 59 наведений графік, що показує середню зміну рівня LDH від початкового рівня з плином часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-TMA, після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

45 На ФІГУРІ 60 наведений графік, що показує середню зміну рівня гаптоглобіну від початкового рівня з плином часу (тижні) у суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-TMA, після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

50 Як показано на ФІГУРАХ 59 і 60, в процесі лікування спостерігалось статистично значуще поліпшення показників для LDH і гаптоглобіну. Як показано на ФІГУРІ 58, кількість тромбоцитів збільшилася, але це збільшення не досягло рівня статистичної значущості для такої невеликої кількості пацієнтів. З трьох пацієнтів, що завершили лікування, у одного не спостерігали поліпшення показників для креатиніну, але він паралельно отримував нефротоксичні засоби. У інших двох пацієнтів показники для креатиніну поліпшилися або залишалися нормальними. Під час тривалого періоду подальшого спостереження у одного пацієнта сталося відторгання трансплантата, і він чекає другий трансплантат. Інші два пацієнти залишаються стабільними.

55 Незважаючи на потенційно змішані ефекти лікарських засобів, пов'язаних з придушенням функції кісткового мозку і нефротоксичністю, у двох суб'єктів, корисні ефекти лікування OMS646 спостерігали у трьох суб'єктів, які страждають на стійку HSCT-TMA (один з яких описаний в прикладі 45), і вони додатково описані нижче. Примітно, що ефекти лікування у кожного з трьох пацієнтів, що відповіли на лікування були уперше відмічені через приблизно три тижні лікування OMS646.

Пацієнт № 1 (отримував лікування протягом 4 тижнів, як описано в прикладі 45). Коротко, кількість тромбоцитів збільшилася в чотири рази, внаслідок чого кількість тромбоцитів склала більше за 100000/мкл; рівень гаптоглобіну виріс більш ніж в два рази і був нормальним; рівень в плазмі лактатдегідрогенази поменшав на 35 %, але все ще залишався вищим за норму; і кількість шистоцитів зберігалася на рівні одного.

Пацієнт № 2 (отримував лікування протягом 8 тижнів): кількість тромбоцитів не змінилася в процесі лікування, хоч пацієнт також страждав від придушення функції кісткового мозку внаслідок паралельного лікування валганцикловіром, і у нього згодом сталося відторгання трансплантата; рівень в плазмі лактатдегідрогенази знизився від 712 Од/л до всього лише 256 Од/л; рівень гаптоглобіну збільшився від рівнів, які не піддаються виявленню, аж до 250 мг/дл.

Пацієнт № 3 (отримував лікування протягом 8 тижнів): кількість тромбоцитів збільшилася від 13500/мкл до 133000/мкл; рівень в плазмі лактатдегідрогенази знизився від 537 до 225 Од/л, рівень гаптоглобіну збільшився від рівнів, які не піддаються виявленню, аж до 181 мг/дл.

Резюме результатів

Для трьох пацієнтів, які страждають на стійку пов'язану з HSCT TMA, що завершили введення доз OMS646, дані показують сильну і стійку ефективність. Статистично значуще поліпшення показників LDH і гаптоглобіну спостерігали в процесі лікування. Кількість тромбоцитів збільшилася, але це збільшення не досягло рівня статистичної значущості для такої невеликої кількості пацієнтів. З трьох пацієнтів, що завершили лікування, показник для креатиніну не поліпшився у одного пацієнта, але він паралельно приймав нефротоксичні засоби. У інших двох пацієнтів показники для креатиніну поліпшилися або залишалися нормальними.

Висновки

OMS646 приводило до поліпшення маркерів TMA у пацієнтів, які страждають на стійку HSCT-TMA, які не відповідали на консервативні методи лікування. Пацієнти з HSCT-TMA, що отримували OMS646, належать до числа найбільш важко пацієнтів, що піддаються лікуванню, внаслідок чого отримані результати є клінічним доказом терапевтичного ефекту OMS646 у пацієнтів з небезпечної стійкої HSCT-TMA, що зберігається незважаючи на застосування консервативних методів лікування.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплекменту. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на стійкої TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до консервативних методів лікування. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, страждаючої від стійкої TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до консервативних методів лікування, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплекменту.

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більше з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в in vitro аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою однокланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплекменту).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, асоційованого з TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, наприклад, збільшення кількості тромбоцитів (наприклад, збільшення щонайменше в два, щонайменше в три, щонайменше в чотири рази кількості тромбоцитів до початку лікування), підвищення рівня гаптоглобіну і/або зниження рівня лактатдегідрогенази.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла

суб'єкту, який страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше одного дня або тижня, або двох тижнів, або трьох тижнів, або чотирьох тижнів або більш), з подальшим введенням інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту підшкірно протягом

5 другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протяжністю щонайменше два тижні або довше). У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують без плазмотерапії. У деяких варіантах здійснення введення в перший і/або другий період часу виконують в поєднанні з плазмотерапією.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла

10 суб'єкту, який страждає на ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, щонайменше кожні два тижні, або щонайменше один раз на тиждень, наприклад, два рази на тиждень або три рази на тиждень. Інгібуюче MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як

15 екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на стійкої ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, включаючи введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить

20 CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення композиція містить інгібуюче MASP-2 антитіло, що містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого

25 ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого

30 ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіант, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i

35 варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, ТМА, пов'язаної з HSCT, включаючи суб'єкта, який страждає на стійкої ТМА, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, яка стійка до консервативних методів лікування, композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70, в дозі від 1 мг/кг до 10 мг/кг (тобто, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3

50 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг або 10 мг/кг) щонайменше один раз на тиждень (наприклад, щонайменше два рази на тиждень або щонайменше три рази на тиждень) протягом періоду часу щонайменше 3 тижня або щонайменше 4 тижня, або щонайменше 5 тижнів, або щонайменше 6 тижнів, або щонайменше 7 тижнів, або щонайменше 8 тижнів.

Приклад 47

У даному прикладі описаний клінічний випадок, що демонструє ефективність лікування пов'язаною з реакцією трансплантат проти хазяїна (GVHD) мікроангіопатії інгібуючим MASP-2 антитілом OMS646.

Передумови

Реакція трансплантат проти хазяїна є звичайним ускладненням трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT). Існують як гостра, так і хронічна, форми, які виникають внаслідок того, що донорські імунні клітини сприймають тканини пацієнта-реципієнта, як чужорідні. Це запускає імунну відповідь проти пацієнта-реципієнта. Гостра GVHD виникає у приблизно 50 % або більше за пацієнтів, що отримали аlogenні трансплантати. При гострою GVHD мішенню частіше за все є шкіра, шлунково-кишковий тракт і печінка, але вона також може торкатися нирки, очі, легкі і клітини крові. Хронічна GVHD розвивається у приблизно 40 % пацієнтів, що отримали аlogenні трансплантати, і частіше за все вражає шкіру, печінку, очі, шлунково-кишковий тракт і легкі. Як гостра, так і хронічна, GVHD пов'язані з високою захворюваністю і смертністю.

Методи і результати

46-річний чоловік, який страждає на Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (T-ALL), під час другої повної ремісії (ПР) пройшов повне мієлоаблативне кондиціонування циклофосфамідом з опроміненням всього тіла (TBI-Cy) і переніс аlogenну HSCT трансплантацію стовбурових клітин периферичної крові (PBSC) від неродинного донора - 35-річної жінки, 9/10 HLA-сумісної (антигенне неспівпадання в локусі A). Профілактика реакції трансплантат проти хазяїна (GVHD) була заснована на застосуванні антиtimoцитарного глобуліну (ATG, 5 мг/кг) в процесі кондиціонування, циклоспорину А (CSA) і короткого курсу метотрексату (тобто, метотрексат в день +1, +3, +6 (зменшення дози внаслідок низького змісту CD34+)). У пацієнта було досягнуто надійне гематологічне відновлення (приживлення трансплантата: БКК >1000/мл, нейтрофіли >500/мл в день +15; тромбоцити >20000/мл в день +18, 50000/мл в день +21). Спостерігали повний донорський химеризм (кістковий мозок і периферична кров, CD3+ і CD3-фракція) в день +30, +60, +90, +180, +354. Повна ремісія була підтверджена (імунофенотип, молекулярне MRD) в день +30, +60, +90, +180.

У день +35 після трансплантації у пацієнта розвинулася шлунково-кишкова (ШК) GVHD (з виявами у вигляді блювоти, анорексії, діареї, болю в області живота; при колоноскопії: дифузні ерозії; гістологія: дифузні покриття виразками слизової оболонки, лімфогранулоцитарне запалення у власній пластинці слизової оболонки, деформація залози і крипти, апоптотичні тільця), і у нього була діагностована гостра GVHD, 4 стадії (кишечник), із загальним балом 4, нарівні з викликаним цитомегаловірусом (CMV) колітом (визначеним за позитивним результатом імуногістохімічного аналізу і результатом ПЛР в реальному часі біопсійного зразка кишечника; системна реактивація CMV (2614 МО/мл в периферичній крові). Два стани одночасно лікували метилпреднізолоном (1 мг/кг), фоскарнетом і ганцикловіром, з хорошим результатом, і стероїдами в поступово зменшуваних, до скасування, дозах.

У день +121 після трансплантації у пацієнта трапився рецидив рефрактерного до стероїдів ШК GVHD (з виявами у вигляді блювання, анорексії, діареї, болю в області живота; гістологічними порушеннями (в шлунку і дванадцятипалій кишці), і у нього був діагностований пізній початок гострої ШК GVHD 4 стадії (кишечник), із загальним балом 4, яку лікували, з хорошим результатом, постійним введенням CSA і послідовним введенням пентостатину і мезенхімальних стовбурових клітин відповідно до зареєстрованого клінічного випробування (ClinicalTrials.gov Identifier NCT02032446).

У день +210 після трансплантації у пацієнта спостерігалось зниження маси тіла, виражена астения, генералізована м'язова атрофія, тетрапарез, зниження глибоких сухожильних рефлексів, двостороння парестезія ікри, нейрогенний сечовий міхур і недержання сечі при відсутності сечовипускного подразника. Результати клінічного обстеження і аналізу цереброспинальної рідини, нейрорадіологічного і електрофізіологічного обстеження вказували на аксональну, сенсорно-рухову і вегето-судинну поліневропатію. Нейрорадіологічне дослідження показало нормальну картину МРТ (мозок і хребет), і цереброспинальна рідина була в нормі. Рецидив T-ALL, інфекції, пошкодження судин, недостатність харчування, демієлінізуюче захворювання і синдром оборотної задньої енцефалопатії (PRES) були виключені. Введення високої дози імуноглобуліну не принесло користь. Була виявлена супутня тромбоцитопенія ($6 \times 10^9/\text{л}$) з ознаками макроангіопатичної гемолітичної анемії (6,7 г/дл) без ниркової недостатності, ретикулоцитоз ($335 \times 10^9/\text{л}$), підвищений рівень LDH (1635 Од/л) і рівні гаптоглобіну, які не піддаються виявленню. Прямий антиглобуліновий тест дав негативний результат. Результати аналізів: шизоцити в мазку периферичної крові (2-3/поле 50х), відсутність анти-B Ат (основна несумісність пацієнта/донора), активність ADAMTS-13 в нормі, відсутність

анти-ADAMTS-13 Ат, нормальні результати тестів на коагуляцію і протеїнурія з нормальними рівнями креатиніну. У нього також мала місце мелена, з документованим покриттям виразками кишечника при ендоскопічному обстеженні; при гістопатологічному дослідженні був виявлений набряк слизової оболонки, фіброз, розширений дрібні судини з внутрішньопросветним відкладенням фібрину, гландулярна атрофія і апоптотичні тільця, без мікробного зараження. Таким чином, хоч мали місце ознаки стійкої ШК GVHD, клінічна і гістопатологічна картина також відповідала діагнозу пов'язаної з трансплантатом тромботичної мікроангіопатії кишечника. Через рецидивуючу ШК GVHD дозу CSA поступово зменшували, але препарат не відміняли (мінімальний рівень 100-150 нг/мл), без досягнення клінічних або гематологічних змін.

У день +263 після трансплантації пацієнт був включений в клінічне випробування, описане вище в прикладах 45 і 46, яке включало лікування за допомогою OMS646, інгібуючого MASP-2 антитіла, якому інгібує лектиновий шлях активації комплементу. Як показано на ФІГУРІ 61, після перших 2 щотижневих доз лікарського засобу спостерігали зміну клінічних ознак і лабораторних показників, із зникненням мелени і гемолізу, і збільшенням кількості тромбоцитів. Цікаво, що після 4 доз також було задокументувати значне неврологічне поліпшення, з поліпшенням як клінічних, так і електрофізіологічних показників сенсорно-рухових порушень. Після 8 доз OMS646 стан GvHD зберігався, незважаючи на зменшення доз CSA, без токсичності, що спостерігається. До дня +354 після трансплантації у пацієнта спостерігали подальше неврологічне поліпшення і початок усунення проблем з сечовипусканням. Швидке клінічне поліпшення, досягнуте у даного пацієнта, свідчить про те, що ефективне інгібування опосередкованого комплементом пошкодження ендотелію внаслідок введення OMS646 може бути високоефективним в лікуванні пов'язаною з GVHD TMA.

Підводячи підсумок, в даному прикладі описаний клінічний випадок пацієнта після HSCT трансплантації, що має одночасно HSCT-TMA і GvHD, обидва стани припинилися після лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646). До початку лікування OMS646 у пацієнта був важкий пост-трансплантаційне стан, ускладнений множинними епізодами рефрактерної до стероїдів GvHD, цитомегаловірусною інфекцією і HSCT-TMA. Після двох попередніх епізодів GvHD у пацієнта розвинулася кривава діарея. Результати біопсії кишечника показали наявність як HSCT-TMA, так і GvHD. Не було виявлено ніякої інфекції. Примітно, що у пацієнта також уперше виникли неврологічні симптоми парестезії, тетраплегії і нейрогенного сечового міхура, які були розцінені як неврологічні вияви GvHD і TMA. Пацієнт не міг ходити внаслідок тетраплегії і потребував переливання крові щонайменше один раз в доби. Гематологічні маркери показали наявність HSCT-TMA з тромбоцитопенією, підвищеним рівнем лактатдегідрогенази (LDH) і шизоцитами. Пацієнт був включений в клінічне випробування і почав отримувати OMS646. Його лікування імунодепресантами (циклоспорин) було скорочене на 2 тижні раніше, і він отримував лише низьку дозу кортикостероїдів, враховуючи його рефрактерну до стероїдів GvHD в анамнезі. Він не отримував інше лікування від GvHD. Його кривава діарея припинилася, і його гематологічні маркери поліпилися після 2 доз OMS646. Після 4 доз OMS646 він зміг ходити. Він завершив 8-тижневий лікування OMS646 і, знаходячись вдома, відчуває себе добре. Всі ознаки і симптоми HSCT-TMA і GvHD припинилися. Його неврологічні симптоми продовжують слабшати. До лікування OMS646 даний пацієнт гаснув і мав високий ризик ранньої смерті. Після лікування OMS646 спостерігали зменшення виявів GvHD, HSCT-TMA і неврологічних симптомів, і, знаходячись вдома, пацієнт відчуває себе добре.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на, або має ризик розвитку, реакції трансплантат проти хазяїна (GVHD), який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу, і за рахунок цього лікування, або зменшення ризику розвитку, GVHD, або зменшення ступеню тяжкості одного або більше симптомів, пов'язані з GVHD. У одному варіанті здійснення GVHD являє собою активну гостру GVHD. У одному варіанті здійснення GVHD являє собою хронічну GVHD. У одному варіанті здійснення GVHD є резистентною до стероїдів (тобто, стійкою, незважаючи на лікування стероїдами). У одному варіанті здійснення GVHD являє собою шлунково-кишкову (ШК) GVHD. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає етап визначення наявності GVHD у суб'єкта перед початком лікування інгібуючим MASP-2 антитілом.

У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, GVHD, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на, або має ризик розвитку, GVHD, асоційованої з TMA, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин. У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на лейкозу, такого як Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз.

У одному варіанті здійснення суб'єкт страждає на один або більше неврологічних симптомів,

пов'язаних з GvHD і/або ТМА, таких як, наприклад, астенія, парестезія, тетраплегія, сенсорно-рухові порушення, вегето-судинна поліневропатія і/або нейрогенний сечовий міхур, і інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, і протягом періоду часу, які достатні для полегшення одного або більш неврологічних симптомів.

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібуює відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібуює відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібуює лектиновий шлях і істотно не інгібуює класичний шлях (тобто, інгібуює лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, асоційованого з GvHD.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на GVHD, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, щонайменше кожні два тижні, або щонайменше один раз на тиждень, наприклад, два рази на тиждень або три рази на тиждень. Інгібуюче MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на GVHD, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, включаючи введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення композиція містить інгібуюче MASP-2 антитіло, що містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіант, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), i варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, який страждає на, або що

має ризик розвитку, GVHD, такого як суб'єкт, який буде отримувати, отримує або отримав HSCT, включаючи суб'єкта, який страждає на пов'язаної з GVHD TMA, композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70, в дозі від 1 мг/кг до 10 мг/кг (тобто, 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 або 10 мг/кг) щонайменше один раз на тиждень (наприклад, щонайменше два рази на тиждень або щонайменше три рази на тиждень) протягом періоду часу щонайменше 3 тижня або щонайменше 4 тижня, або щонайменше 5 тижнів, або щонайменше 6 тижнів, або щонайменше 7 тижнів, або щонайменше 8 тижнів.

Приклад 48

У даному прикладі описаний клінічний випадок, що демонструє ефективність лікування TMA і дифузної альвеолярної кровотечі (DAH) після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин інгібуючим MASP-2 антитілом OMS646.

Передумови

Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT) індукує значне ендотеліальне пошкодження, яке вносить внесок в серйозні пост-HSCT ускладнення, такі як тромботична мікроангіопатія (TMA), реакція трансплантат проти хазяїна (GvHD), дифузна альвеолярна кровотеча (DAH) і венооклюзійна хвороба (VOD). (Дивись E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, 2011; Akil et al., Biol Blood Marrow Transplant 21:1739-1745, 2015; і Vion et al., Semin Thromb Hemost 41(06):629-643, 2015, зміст кожної з публікацій включений в цей документ за допомогою посилання).

Дифузна альвеолярна кровотеча (DAH) являє собою синдром, який може розвиватися у реципієнта трансплантата гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT). Діагностичні критерії DAH у реципієнта HSCT включають легеневі інфільтрати, диспне і гіпоксію (дивись публікацію E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, 2011, зміст якої включений в цей документ за допомогою посилання). Передбачуванним патогенезом DAH є пошкодження легеневого капілярного ендотелію за рахунок кондиціонування HSCT, плюс пересаджені нейтрофіли і приховані інфекції, що роблять можливою витік еритроцитів в легеневі альвеоли (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502). Венооклюзійна хвороба (VOD), також відома як синдром синусоїдальної обструкції (SOS), є іншим синдромом, який може розвиватися у трансплантат гемопоетичних, що отримав стовбурових клітин (HSCT) пацієнта. Клінічні вияви VOD включають виражене збільшення маси тіла внаслідок затримки рідини, збільшення розміру печінки і підвищення рівнів білірубіну в крові (дивись E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, зміст публікації включений в цей документ за допомогою посилання).

Методи і результати

Демографія і анамнез

Пацієнткою була біла дівчина у віці 14 років в момент початку лікування, яку в даному прикладі називають "одержуючою лікування зі співчуття пацієнткою № 1". Пацієнтка мала в анамнезі анемію Даймонда-Блекфана і синдром пустого турецького сідла.

Вихід для пацієнтки

Пацієнтка жива в день 877.

Захворювання, що приводить до необхідності трансплантації

Пацієнтка мала в анамнезі анемію Даймонда-Блекфана. Дівчина отримувала необхідні інфузії еритроцитів кожні 3 тижні з дитячого віку, і раніше у неї розвинулося перевантаження залізом.

Трансплантат

Пацієнтка отримала трансплантат стовбурових клітин у вересні 2015 р. Дівчина отримала трансплантат PBSC від співпадаючого на 9/10 неродинного донора. Приживлення нейтрофілів сталося приблизно до дня 35. Приживлення тромбоцитів не було досягнуте до дня 184. Дівчині були необхідні інфузії тромбоцитів і еритроцитів протягом терміну більш 1 року.

Ускладнення після трансплантації

У пацієнтки був важкий пост-трансплантаційне стан. Незабаром після виписки дівчина була знову госпіталізована в день 67 через утруднене дихання і передбачувану пневмонію. Вона була виписана в день 162. Дівчина була знову госпіталізована в день 167 з реактивацією вітряної віспи, яку лікували ацикловіром, і полісерозитом, який лікували кортикостероїдами. У неї була стійка тромбоцитопенія і анемія, підвищений рівень LDH, знижений рівень гаптоглобіну, шизоцити і негативні результати прямого тесту на антитіла. Був поставлений діагноз TMA. Застосування імунодепресантів змінили на MMF і преднізон. У неї також сталася реактивація

HHV6 і EBV. Дівчина була виписана в день 197.

У день 229 вона знову була госпіталізована зі стійкої ТМА і важкою дихальною недостатністю. У неї була діагностована дифузна альвеолярна кровотеча, яку лікували СРАР і кортикостероїдами. У день 231 у неї трапився випот в плевральній порожнині і перикардії з погіршенням оксигенації. Її кров'яний тиск підвищився. Їй було потрібне введення інгібітора АСЕ, блокатора кальцієвих каналів, бета-блокатора, диуретика і нітроглицерина для контролю кров'яного тиску. Вона випробовувала судоми, і додатково почали вводити клонидин. МРТ мозку показала залізо в мозку, що узгоджувалося з наявністю повторного гемохроматоза внаслідок переливаний їй еритроцитів. Гемодіаліз був початий в день 231. У день 259 вона почала отримувати екулізумаб через ниркову дисфункцію, що продовжується і погіршення легеневого статусу. Її показники ТМА поліпшилися, але у неї розвинувся гострий легеневий набряк, і введення екулізумабу припинили. Її показники ТМА погіршилися, і вона отримувала плазмаферез в дні 269, 276 і 278, без поліпшення. Вона отримувала дефібротид, який був відмінений із-за коагулопатії і відсутності поліпшення ТМА. Вона знову почала отримувати низьку дозу екулізумабу, починаючи приблизно в день 320. Введення екулізумабу було знову припинено через легеневий набряк. ТМА зберігалася. У дівчини також розвинулася інфекція *C. difficile*. Вона була виписана з лікарні в день 379 і отримувала преднізон, MMF, вориконазол, клотримазол, амлодипін, еритропоетин, урсодиол і омепразол.

Дівчина була знову госпіталізована в день 380 з лихоманкою, ознобом і диспное. У неї розвинулася викликана *K. pneumoniae* пневмонія і викликаний *E. faecium* сепсис. Введення MMF було зупинено. Її лікували тазоцином, меропенемом і ванкомицином. При стійкій бактериемії, їй змінили центральний катетер і замінили антибіотики на лінезолід, даптоміцин і кліндаміцин. Її ТМА зберігалася, що створювало необхідність в гемодіалізі 3 рази на тиждень і щоденному переливанні тромбоцитарної маси. Легеневий набряк був діагностований як дифузна альвеолярна кровотеча (яке лікували кортикостероїдами, але безрезультатно). У день 404 було почато лікування OMS646 з співчуття. Як описано в цьому документі, OMS646 являє собою інгібуюче MASP-2 антитіло, яке інгібує лектиновий шлях активації комплементу.

Дівчині вводили 3 рази на тиждень дозу 4 мг/кг OMS646. Інгаляторне введення кисня їй було припинено, і доза кортикостероїдів для неї була знижена. Її лабораторні маркери ТМА поліпшилися. Вона була виписана в день 414.

Вона продовжувала амбулаторне лікування OMS646 3 рази на тиждень, і в день 416 гемодіаліз для неї був скорочений до одного разу на тиждень. Список антигіпертензивних препаратів, що приймаються нею був скорочений до амлодипіна, клонидина і фурсемида. У день 423 вона змогла припинити гемодіаліз, і в день 428 введення їй OMS646 було скорочено до двох разів на тиждень, із зменшенням доз, що приймаються нею кортикостероїдів і фурсемида. Переливання їй тромбоцитарної маси було значно скорочено протягом цього періоду.

Її стан поліпшувався до дня 486, коли у неї розвинулася інфекція RSV. Рівні креатиніну і LDH у неї підвищилися, а кількості тромбоцитів і гаптоглобіну впали. У неї була діагностована рецидивуюча ТМА, і введення OMS646 було збільшене до 3 разів на тиждень. Її ТМА припинилася із збільшенням кількості введення OMS646.

Дівчина більше не отримувала гемодіаліз, і її останнє переливання тромбоцитарної маси було проведене приблизно в день 630. У цей час вона відчуває себе непогано і отримує OMS646, дезферриоксамін, левотироксин, севеламер, аугментин, леветирацетам, аллопуринол, амлодипін, небиволол, клонидин і еритропоетин. Їй проводять флеботомію через гемохроматоз.

Епізоди ТМА

У даної пацієнтки був важкий стан зі стійкою і/або рецидивуючою ТМА. Течія її захворювання відповідала поліорганної ТМА, і у неї була дифузна альвеолярна кровотеча (DAH), інший синдром ендотеліального пошкодження. Вона спочатку відповідала на екулізумаб, але не переносила лікування. Перед початком лікування OMS646 вона отримувала гемодіаліз, і їй були потрібні щоденні переливання крові. Незабаром після початку лікування OMS646 її ТМА припинилася, її DAH припинилося, і вона змогла припинити діаліз. Пізніше для неї стало можливо значно скоротити, а ще пізніше припинити, переливання тромбоцитів і еритроцитів, з підтримкою стабільних або рівнів, що збільшуються тромбоцитів і гемоглобіну. Ці результати представлені на ФІГУРАХ 62A-62E таким чином:

На ФІГУРІ 62A наведений графік, що показує рівень креатиніну залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнтки № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

На ФІГУРІ 62B наведений графік, що показує рівень гаптоглобіну залежно від часу при

лікуванні зі співчуття пацієнтки № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

На ФІГУРІ 62C наведений графік, що показує рівень гемоглобіну залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнтки № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

На ФІГУРІ 62D наведений графік, що показує рівень LDH залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнтки № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

На ФІГУРІ 62E наведений графік, що показує рівень тромбоцитів залежно від часу при лікуванні зі співчуття пацієнтки № 1, де вертикальна лінія відмічає початок лікування інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646).

Загалом, клінічна ситуація даної пацієнтки показує успішне лікування TMA і ДАН за допомогою OMS646, що дозволило пацієнтці припинити кисневу терапію, гемодіаліз і переливання крові.

Резюме

Підводячи підсумок, в даному прикладі описаний клінічний випадок HSCT-TMA у дівчини-підлітка (одержуючої лікування зі співчуття пацієнтки № 1), яка не переносила введення екулізумабу, але добре відповідала на лікування, що застосовується зі співчуття OMS646. Незабаром після початку лікування OMS646 її TMA припинилася, її ДАН припинилося, і їй можна було припинити діаліз. У прикладі 47 описаний інший клінічний випадок HSCT-TMA у пацієнта з важким станом після трансплантації, що включає резистентну до стероїдів GvHD і цитомегаловірусну інфекцію. У нього розвинулася TMA, яка не піддавалася лікуванню консервативними методами, і одночасно розвинулася GvHD з множинними неврологічними ускладненнями, через яких він не міг ходити. Як описано в прикладі 47, після лікування OMS646 його TMA і GvHD припинилися, і його неврологічні ускладнення поменшали. Він зміг повернутися до роботи, і його неврологічний статус продовжував поліпшуватися.

Поліпшення показників загальної виживаності і маркерів TMA у реципієнтів HSCT, в поєднанні з дозволом GvHD і дозволом дифузної альвеолярної кровотечі, у цих важко хворих пацієнтів вказує на роль, яку лектиновий шлях грає в цих захворюваннях, а також на ефективність використання інгібуючого MASP-2 антитіла OMS646 в лікуванні і/або запобіганні TMA внаслідок трансплантації стовбурових кліткам, реакції трансплантат проти хазяїна і дифузної альвеолярної кровотечі.

Відповідно до вищевикладеного, в одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на дифузної альвеолярної кровотечі, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин (тобто, реципієнта HSCT), який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплекменту. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, страждаючої від дифузної альвеолярної кровотечі, пов'язаної з HSCT, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплекменту.

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одностанцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплекменту).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, асоційованого з дифузною альвеолярною кровотечею у реципієнта HSCT. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на дифузної альвеолярної кровотечі, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, щонайменше кожні два тижні, або

щонайменше один раз на тиждень, наприклад, два рази на тиждень або три рази на тиждень. Інгібуюче MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на дифузної альвеолярної кровотечі, пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, включаючи введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення композиція містить інгібуюче MASP-2 антитіло, що містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіант, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності) з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, дифузної альвеолярної кровотечі, пов'язаного з HSCT, композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70, в дозі від 1 мг/кг до 10 мг/кг (тобто, 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 або 10 мг/кг) щонайменше один раз на тиждень (наприклад, щонайменше два рази на тиждень або щонайменше три рази на тиждень) протягом періоду часу щонайменше 3 тижня або щонайменше 4 тижня, або щонайменше 5 тижнів, або щонайменше 6 тижнів, або щонайменше 7 тижнів, або щонайменше 8 тижнів.

Відповідно до вищевикладеного, в іншому варіанті здійснення винахід стосується способу лікування суб'єкта-людини, який страждає на венооклюзійної хвороби (VOD), пов'язаної з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин (тобто, реципієнта HSCT), який включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплексу. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, страждаючої від венооклюзійної хвороби, пов'язаної з HSCT, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплексу.

Відповідно до будь-кого з розкритих в цьому документі варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло має щонайменше одну або більш з наступних характеристик: вказане антитіло зв'язує людський MASP-2 з величиною K_D , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло зв'язує епітоп в домені CCP1 MASP-2, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в *in vitro* аналізі в 1 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 10 нМ або менше, вказане антитіло інгібує відкладення C3b в 90 % людській сироватці з величиною IC_{50} , що становить 30 нМ або

менше, при цьому антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка складається з Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ і F(ab')₂, при цьому антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG2, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG1, при цьому вказане антитіло являє собою молекулу IgG4, при цьому молекула IgG4 має мутацію S228P. У одному варіанті здійснення антитіло зв'язує MASP-2, вибірково інгібує лектиновий шлях і істотно не інгібує класичний шлях (тобто, інгібує лектиновий шлях, не торкаючись класичний шлях комплементу).

У одному варіанті здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять в кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більш клінічних параметрів, асоційованого з венооклюзійною хворобою, у реципієнта HSCT. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, який страждає на венооклюзійної хвороби, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. Лікування може бути хронічним і застосовуватися щодня або щомісяця, але, переважно, щонайменше кожні два тижні, або щонайменше один раз на тиждень, наприклад, два рази на тиждень або три рази на тиждень. Інгібуюче MASP-2 антитіло можна вводити окремо або в поєднанні з інгібітором C5, таким як екулізумаб.

У одному варіанті здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, який страждає на венооклюзійну хворобу, пов'язану з трансплантатом гемопоетичних стовбурових клітин, включаючи введення суб'єкту композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 70. У деяких варіантах здійснення композиція містить інгібуюче MASP-2 антитіло, що містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 31-35 в SEQ ID NO: 67; i ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-65 в SEQ ID NO: 67; i iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 95-107 в SEQ ID NO: 67, i b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 24-34 в SEQ ID NO: 70; i ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 50-56 в SEQ ID NO: 70; i iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність залишків 89-97 в SEQ ID NO: 70, або (II) його варіант, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 67), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 %) ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, який страждає на венооклюзійну хворобу, пов'язану з HSCT, композиції, яка містить певну кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно впізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, впізнаваного еталонним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 67 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO: 70.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, який страждає на, або що має ризик розвитку, венооклюзійної хвороби, пов'язаної з HSCT, композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70, в дозі від 1 мг/кг до 10 мг/кг (тобто, 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 або 10 мг/кг) щонайменше один раз на тиждень (наприклад, щонайменше два рази на тиждень або щонайменше три рази на тиждень) протягом періоду часу щонайменше 3 тижня або щонайменше 4 тижня, або щонайменше 5 тижнів, або щонайменше 6 тижнів, або щонайменше 7 тижнів, або щонайменше 8 тижнів.

При тому, що ілюстративні варіанти здійснення були проілюстровані і описані, потрібно

розуміти, що можуть бути зроблені різні зміни без відхилення від суті і об'єму даного винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5	<110>	Omeros Corporation University of Leicester Demopoulos, Gregory A. Dudler, Thomas Schwaeble, Hans-Wilhelm	
10	<120>	СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ І/АБО ЗАПОБІГАННЯ РЕАКЦІЇ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИ ХАЗЯЇНА І/АБО ДИФУЗНОЇ АЛЬВЕОЛЯРНОЇ КРОВОТЕЧІ І/АБО ВЕНООКЛЮЗІЙНОЇ ХВОРОБИ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ТРАНСПЛАНТАТОМ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН	
15	<130>	MP.1.0278.PCT	
	<150>	62/545.864	
	<151>	2017-08-15	
20	<150>	62/574,690	
	<151>	2017-10-19	
	<150>	62/630.756	
	<151>	2018-02-14	
25	<150>	62/637.281	
	<151>	2018-03-01	
	<160>	71	
30	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	725	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<220>		
40	<221>	КП	
	<222>	(27) .. (584)	
	<400>	1	
45		ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt	53
		Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu	
		1 5	
		ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct	101
50		Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro	
		10 15 20 25	
		gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat	149
		Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn	
		30 35 40	
55		gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg	197
		Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu	
		45 50 55	
60		cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag	245
		Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu	

UA 130965 C2

	60	65	70	
5	tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu 75 80 85			293
10	tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr 90 95 100 105			341
	ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr 110 115 120			389
15	tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu 125 130 135			437
20	gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp 140 145 150			485
25	cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala 155 160 165			533
30	ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu 170 175 180 185			581
	tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc			634
	tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcacccacc			694
35	atggacccaa taataaacct ggccccaccc c			725
40	<210> 2 <211> 185 <212> БИЛОК <213> Homo sapiens <400> 2			
45	Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr 1 5 10 15			
50	Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser 20 25 30			
55	Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr 35 40 45			
60	Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe 50 55 60			
	Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser			

UA 130965 C2

	65		70		75		80
5	Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp	85		90		95	
10	Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser	100		105		110	
15	Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr	115		120		125	
20	Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val	130		135		140	
25	Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu	145		150		155	160
30	Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn	165		170		175	
35	Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu	180		185			
	<210> 3						
	<211> 170						
	<212> БИЖОК						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 3						
40	Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala	1	5	10		15	
45	Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp	20		25		30	
50	Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His	35		40		45	
55	Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu	50		55		60	
60	Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr	65		70		75	80
	Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser	85		90		95	

	Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	
				100					105					110			
5	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	
			115					120					125				
10	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	
		130					135					140					
15	Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	
	145					150					155					160	
20	Asn	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Glu	Gln	Ser	Leu							
					165					170							
	<210>	4															
	<211>	2460															
	<212>	ДНК															
25	<213>	Homo sapiens															
	<220>																
	<221>	КП															
30	<222>	(22) .. (2082)															
	<400>	4															
	ggccagctgg	acgggcacac	c	atg	agg	ctg	ctg	acc	ctc	ctg	ggc	ctt	ctg				51
35				Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu				
				1				5					10				
	tgt	ggc	tcg	gtg	gcc	acc	ccc	ttg	ggc	ccg	aag	tgg	cct	gaa	cct	gtg	99
	Cys	Gly	Ser	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	
40					15					20					25		
	ttc	ggg	cgc	ctg	gca	tcc	ccc	ggc	ttt	cca	ggg	gag	tat	gcc	aat	gac	147
	Phe	Gly	Arg	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ala	Asn	Asp	
				30					35					40			
45	cag	gag	cgg	cgc	tgg	acc	ctg	act	gca	ccc	ccc	ggc	tac	cgc	ctg	cgc	195
	Gln	Glu	Arg	Arg	Trp	Thr	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	
			45					50					55				
	ctc	tac	ttc	acc	cac	ttc	gac	ctg	gag	ctc	tcc	cac	ctc	tgc	gag	tac	243
50	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	
		60					65					70					
	gac	ttc	gtc	aag	ctg	agc	tcg	ggg	gcc	aag	gtg	ctg	gcc	acg	ctg	tgc	291
55	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	
	75					80					85					90	
	ggg	cag	gag	agc	aca	gac	acg	gag	cgg	gcc	cct	ggc	aag	gac	act	ttc	339
	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	
60					95					100					105		
	tac	tcg	ctg	ggc	tcc	agc	ctg	gac	att	acc	ttc	cgc	tcc	gac	tac	tcc	387

UA 130965 C2

	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	
				110					115					120			
5	aac	gag	aag	ccg	ttc	acg	ggg	ttc	gag	gcc	ttc	tat	gca	gcc	gag	gac	435
	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	
			125					130					135				
10	att	gac	gag	tgc	cag	gtg	gcc	ccg	gga	gag	gcg	ccc	acc	tgc	gac	cac	483
	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	
		140					145					150					
15	cac	tgc	cac	aac	cac	ctg	ggc	ggg	ttc	tac	tgc	tcc	tgc	cgc	gca	ggc	531
	His	Cys	His	Asn	His	Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	
	155					160					165					170	
	tac	gtc	ctg	cac	cgt	aac	aag	cgc	acc	tgc	tca	gcc	ctg	tgc	tcc	ggc	579
	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	
					175					180				185			
20	cag	gtc	ttc	acc	cag	agg	tct	ggg	gag	ctc	agc	agc	cct	gaa	tac	cca	627
	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	Arg	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	
				190					195					200			
25	cgg	ccg	tat	ccc	aaa	ctc	tcc	agt	tgc	act	tac	agc	atc	agc	ctg	gag	675
	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	
			205					210					215				
30	gag	ggg	ttc	agt	gtc	att	ctg	gac	ttt	gtg	gag	tcc	ttc	gat	gtg	gag	723
	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	
		220					225					230					
35	aca	cac	cct	gaa	acc	ctg	tgt	ccc	tac	gac	ttt	ctc	aag	att	caa	aca	771
	Thr	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	
	235					240				245						250	
	gac	aga	gaa	gaa	cat	ggc	cca	ttc	tgt	ggg	aag	aca	ttg	ccc	cac	agg	819
	Asp	Arg	Glu	Glu	His	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	
					255					260					265		
40	att	gaa	aca	aaa	agc	aac	acg	gtg	acc	atc	acc	ttt	gtc	aca	gat	gaa	867
	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	
				270				275					280				
45	tca	gga	gac	cac	aca	ggc	tgg	aag	atc	cac	tac	acg	agc	aca	gcg	cag	915
	Ser	Gly	Asp	His	Thr	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	
			285					290					295				
50	cct	tgc	cct	tat	ccg	atg	gcg	cca	cct	aat	ggc	cac	gtt	tca	cct	gtg	963
	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	Met	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Val	Ser	Pro	Val	
		300					305					310					
55	caa	gcc	aaa	tac	atc	ctg	aaa	gac	agc	ttc	tcc	atc	ttt	tgc	gag	act	1011
	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	Cys	Glu	Thr	
	315					320					325					330	
	ggc	tat	gag	ctt	ctg	caa	ggg	cac	ttg	ccc	ctg	aaa	tcc	ttt	act	gca	1059
	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	His	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	
					335					340					345		
60	gtt	tgt	cag	aaa	gat	gga	tct	tgg	gac	cgg	cca	atg	ccc	gcg	tgc	agc	1107
	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Ala	Cys	Ser	

UA 130965 C2

	350	355	360	
5	att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu 365 370 375	1155		
10	tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr 380 385 390	1203		
15	agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr 395 400 405 410	1251		
20	gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser 415 420 425	1299		
25	ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly 430 435 440	1347		
30	ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp 445 450 455	1395		
35	caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr 460 465 470	1443		
40	gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His 475 480 485 490	1491		
45	gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser 495 500 505	1539		
50	cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly 510 515 520	1587		
55	tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu 525 530 535	1635		
60	aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro 540 545 550	1683		
65	aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala 555 560 565 570	1731		
70	tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met 575 580 585	1779		
75	tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr 590 595 600	1827		

	gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt	1875
	Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys	
	605 610 615	
5		
	gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga	1923
	Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly	
	620 625 630	
10		
	ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga	1971
	Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly	
	635 640 645 650	
15		
	gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat	2019
	Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr	
	655 660 665	
20		
	gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata	2067
	Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile	
	670 675 680	
25		
	att agt gat ttt taa cttgctgtgc tgcagtcgaag gattcttcat ttttagaaat	2122
	Ile Ser Asp Phe	
	685	
30		
	gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg	2182
	gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact	2242
35		
	tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca	2302
	gtcatctttg cccaccagc gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa	2362
	gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg	2422
	tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2460
40		
	<210> 5	
	<211> 686	
	<212> БИЛОК	
	<213> Homo sapiens	
45		
	<400> 5	
	Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr	
	1 5 10 15	
50		
	Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser	
	20 25 30	
55		
	Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr	
	35 40 45	
60		
	Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe	
	50 55 60	

UA 130965 C2

	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	65	70	75	80
5	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	85	90	95	
10	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	100	105	110	
15	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	115	120	125	
20	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	130	135	140	
25	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	Leu	145	150	155	160
30	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn	165	170	175	
35	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	Arg	180	185	190	
40	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	195	200	205	
45	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	210	215	220	
50	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Thr	Leu	225	230	235	240
55	Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	His	Gly	245	250	255	
60	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	260	265	270	
	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Thr	Gly	275	280	285	
	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	Met	290	295	300	
	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Val	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu				

UA 130965 C2

	305				310					315					320	
5	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gln
					325					330					335	
10	Gly	His	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly
				340					345					350		
15	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Ala	Cys	Ser	Ile	Val	Asp	Cys	Gly	Pro
			355					360					365			
20	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Gly
		370					375					380				
25	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe
	385					390					395					400
30	Tyr	Thr	Met	Lys	Val	Asn	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly
				405						410					415	
35	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Glu	Pro
			420					425						430		
40	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Arg	Ile	Tyr	Gly	Gly
		435						440					445			
45	Gln	Lys	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Gly
		450					455					460				
50	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Tyr	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	Thr
	465					470					475					480
55	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Gln	Lys	His	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp
				485						490					495	
60	Ile	Arg	Met	Gly	Thr	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	Ala
			500						505					510		
65	Trp	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Asp	Ala	Gly
			515					520					525			
70	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn	Asn	Lys	Val	Val	Ile
		530					535					540				
75	Asn	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Glu	Ser
	545					550					555					560

UA 130965 C2

5 Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr
 565 570 575
 10 Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile
 580 585 590
 15 Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro
 595 600 605
 20 Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
 625 630 635 640
 25 Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
 645 650 655
 30 Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
 660 665 670
 35 Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
 675 680 685
 40 <210> 6
 <211> 671
 <212> BIJOK
 <213> Homo sapiens
 45 Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
 1 5 10 15
 50 Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
 20 25 30
 55 Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45
 60 Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60
 Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

UA 130965 C2

	Asp	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	
					85					90					95		
5	Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	
				100					105					110			
10	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	
			115					120					125				
15	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	
		130					135					140					
20	Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	
	145					150					155					160	
25	Asn	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	
					165					170					175		
30	Arg	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	
				180					185					190			
35	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	
			195					200					205				
40	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Thr	
		210					215					220					
45	Leu	Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	His	
	225					230					235					240	
50	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	
					245					250					255		
55	Asn	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Thr	
				260					265					270			
60	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	
			275					280					285				
65	Met	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Val	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	
		290					295					300					
70	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	
	305					310					315					320	
75	Gln	Gly	His	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	

UA 130965 C2

				325					330					335			
5	Gly	Ser	Trp	Asp 340	Arg	Pro	Met	Pro	Ala 345	Cys	Ser	Ile	Val	Asp 350	Cys	Gly	
10	Pro	Pro	Asp 355	Asp	Leu	Pro	Ser	Gly 360	Arg	Val	Glu	Tyr	Ile 365	Thr	Gly	Pro	
15	Gly	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala 375	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	
	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Val	Asn 390	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp 400	
20	Gly	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Glu	
25	Pro	Val	Cys	Gly 420	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr 425	Thr	Gly	Gly	Arg	Ile 430	Tyr	Gly	
30	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp 440	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	
	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Tyr	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	
35																	
	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Gln	Lys	His	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu 480	
40	Asp	Ile	Arg	Met	Gly 485	Thr	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	
45	Ala	Trp	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Asp	Ala	
50	Gly	Phe	Asp 515	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn	Asn	Lys	Val	Val	
	Ile	Asn	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Glu	
55																	
	Ser	Phe	Met	Arg	Thr	Asp	Asp	Ile	Gly	Thr	Ala	Ser	Gly	Trp	Gly	Leu 560	
60	Thr	Gln	Arg	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Tyr	Val	Asp	Ile	Pro	

	Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr	
	580 585 590	
5		
	Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser	
	595 600 605	
10		
	Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe	
	610 615 620	
15		
	Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp	
	625 630 635 640	
20		
	Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys	
	645 650 655	
25		
	Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe	
	660 665 670	
30		
	<210> 7	
	<211> 4900	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc	60
35	ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga	120
	ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg	180
40	gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggcct caccgcccct	240
	gccctgcccc taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcgggtg gccaccccct	300
	taggcccga gttggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg	360
45	agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc acccccggc taccgcctgc	420
	gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca	480
	aggtgccgtc agacgggagg gctgggggtt ctcaggggtc ggggggtccc aaggagtagc	540
50	caggggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg	600
	ggtcttgctt tcaactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggtgc	660
55	tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt	720
	tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc	780
	cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgaggggtga gccaaagagg gtcttgcaac	840
60	atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct	900

	tcagtttccc	cacctttccc	agggcagggg	agaggcctct	ggcctgacat	catccacaat	960
5	gcaaagacca	aaacagccgt	gacctccatt	cacatgggct	gagtgccaac	tctgagccag	1020
	ggatctgagg	acagcatcgc	ctcaagtgac	gcagggactg	gccgggcgcg	gcagctcacg	1080
	cctgtaattc	cagcactttg	ggaggccgag	gctggcttga	taatttgagg	gtcaggagtt	1140
10	caaggccagc	cagggcaaca	cggtgaaact	ctatctccac	taaaactaca	aaaattagct	1200
	gggcgtggtg	gtgcgcacct	ggaatcccag	ctactaggga	ggctgaggca	ggagaattgc	1260
15	ttgaacctgc	gaggtggagg	ctgcagtga	cagagattgc	accactacac	tccacctggg	1320
	cgacagacta	gactccgtct	caaaaaacaa	aaaacaaaaa	ccacgcaggg	ccgagggccc	1380
	atttacaagc	tgacaaagtg	ggccctgcc	gcgggagcgc	tgaggatgt	ttgattttca	1440
20	gatcccagtc	cctgcagaga	ccaactgtgt	gacctctggc	aagtggctca	atctctctgc	1500
	tccttagaag	ctgctgcaag	ggttcagcgc	tgtagccccg	ccccctgggt	ttgattgact	1560
25	cccctcatta	gctgggtgac	ctcgcccgga	caactgaaact	cccactgggt	taacagaggt	1620
	gatgtttgca	tctttctccc	agcgtgctg	ggagcttgca	gcgaccctag	gcctgtaagg	1680
	tgattggccc	ggcaccagtc	ccgcacccta	gacaggacct	aggcctcctc	tgaggctccac	1740
30	tctgagggtca	tggatctcct	gggaggagtc	caggctggat	ccgcctcctt	tccctcctga	1800
	cggcctgcct	ggcctgcct	ctccccaga	cattgacgag	tgccagggtg	ccccgggaga	1860
35	ggcgcccacc	tgcgaccacc	actgccacaa	ccacctgggc	ggtttctact	gctcctgccg	1920
	cgcaggctac	gtcctgcacc	gtaacaagcg	cacctgctca	ggtgagggag	gctgcctggg	1980
	ccccaacgca	ccctctcctg	ggatacccg	ggctcctcag	ggccattgct	gctctgcca	2040
40	ggggtgcgga	gggcctgggc	ctggacactg	ggtgcttcta	ggcctgctg	cctccagctc	2100
	cccttctcag	cctgcttcc	cctctcagca	gccaggctca	tcagtgccac	cctgccttag	2160
45	cactgagact	aattctaaca	tcccactgtg	tacctggttc	cacctgggct	ctgggaaccc	2220
	ctcatgtagc	cacgggagag	tcggggatat	taccctcggt	ccttggactg	ggttcctggt	2280
	ccctgcactg	ggggacgggc	cagtgcctctg	gggcgtgggc	agccccaccc	tgtggcgctg	2340
50	acctgctcc	cccgactcgg	tttctcctct	cggggctctct	ccttgctctct	ctgatctctc	2400
	ttccagagca	gagcctctag	cctcccctgg	agctccggct	gccagcagg	tcagaagcca	2460
55	gagccaggct	gctggcctca	gctccggggt	gggctgagat	gctgtgcccc	aactccatt	2520
	caccacccat	ggacccaata	ataaacctgg	ccccaccca	cctgctgccg	cgtgtctctg	2580
	gggtgggagg	gtcgggaggc	ggtggggcgc	gctcctctct	gcctaccctc	ctcacagcct	2640
60	catgaacccc	aggtctgtgg	gagcctcctc	catggggcca	cacggtcctt	ggcctcacc	2700

	cctgttttga	agatggggca	ctgaggccgg	agaggggtaa	ggcctcgctc	gagtccaggt	2760
	ccccagaggc	tgagcccaga	gtaatcttga	accacccccca	ttcaggggtct	ggcctggagg	2820
5	agcctgaccc	acagaggaga	caccctggga	gatattcatt	gaggggtaat	ctgggtcccc	2880
	gcaaattccag	gggtgattcc	cactgccccca	taggcacagc	cacgtggaag	aaggcaggca	2940
10	atgttggggc	tcctcacttc	ctagaggcct	cacaactcaa	atgcccccca	ctgcagctgg	3000
	gggtgggggtg	gtggtatggg	atggggacca	agccttcctt	gaaggataga	gccagccca	3060
	acaccccgcc	ccgtggcagc	agcatcacgt	gttcacagca	ggaaggagag	caccagactc	3120
15	agtcattgatc	actgttgctt	tgaacttcca	agaacagccc	cagggcaagg	gtcaaaacag	3180
	gggaaagggg	gtgatgagag	atccttcttc	cggatgttcc	tccaggaacc	agggggctgg	3240
20	ctgggtcttgg	ctgggttcgg	gtaggagacc	catgatgaat	aaacttggga	atcactgggg	3300
	tggctgtaag	ggaatttagg	ggagctccga	aggggccctt	aggctcgagg	agatgctcct	3360
	ctcttttccc	gaattcccag	ggacccagga	gagtgtccct	tcttctctct	cctgtgtgtc	3420
25	catccacccc	cgccccccgc	cctggcagag	ctgggtggaac	tcagtgtctt	agccccctacc	3480
	ctgggggttgc	gactctggct	caggacacca	ccacgtccc	tgggggtgtg	agtgagggcc	3540
30	tgtgcgctcc	atcccagagt	ctgcctgttt	cagctaaagc	ctcaaagcaa	gagaaacccc	3600
	ctctctaagc	ggccccctcag	ccatcgggtg	ggtcgttttg	tttctgggta	ggcctcaggg	3660
	gctggccacc	tgcagggccc	agcccaaccc	agggatgcag	atgtcccagc	cacatccctg	3720
35	tcccagtttc	ctgctcccca	aggcatccac	cctgctgttg	gtgcgagggc	tgatagaggg	3780
	cacgccaagt	cactccccctg	cccttccttc	cttcacagccc	tgtgctccgg	ccaggtcttc	3840
40	acccagaggt	ctggggagct	cagcagccct	gaatacccac	ggccgtatcc	caaactctcc	3900
	agttgcactt	acagcatcag	cctggaggag	gggttcagtg	tcattctgga	ctttgtggag	3960
	tccttcgatg	tggagacaca	ccctgaaacc	ctgtgtccct	acgactttct	caaggtctgg	4020
45	ctcctggggc	cctcatcttg	tcccagatcc	tcccccttca	gccagctgc	acccccctact	4080
	tcctgcagca	tggccccccac	cacgttcccg	tcaccctcgg	tgacccacc	tcttcaggtg	4140
50	ctctatggag	gtcaaggctg	gggcttcgag	tacaagtgtg	ggaggcagag	tggggagggg	4200
	cacccaatc	catggcctgg	gttggcctca	ttggctgtcc	ctgaaatgct	gaggaggtgg	4260
	gttacttccc	tccgcccagg	ccagacccag	gcagctgctc	cccagctttc	atgagcttct	4320
55	ttctcagatt	caaacagaca	gagaagaaca	tggcccattc	tgtgggaaga	cattgccccca	4380
	caggattgaa	acaaaaagca	acacggtgac	catcaccttt	gtcacagatg	aatcaggaga	4440
60	ccacacaggc	tggaagatcc	actacacgag	cacagtgagc	aagtgggctc	agatccttgg	4500
	tggaagcgca	gagctgcctc	tctctggagt	gcaaggagct	gtagagtgtg	gggctcttct	4560

gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgctga ggtctgagga agcagcttct 4620
 aaggggaagc acccgtgccc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680
 5 ccaccattc accatcact catcttttac ccaccaccc tttgccactc atccttctgt 4740
 ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaaccat 4800
 10 ccaccattc ttctacctac ccacccatc catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860
 acccatcctt cggtcgggtca tccatcatca tccatccatc 4900

 15 <210> 8
 <211> 136
 <212> БИЛОК
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 8

 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

 25 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

 30 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45

 35 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60

 40 Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80

 Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95

 45 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110

 50 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125

 55 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
 130 135

 60 <210> 9
 <211> 181
 <212> БИЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 9

5	Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Ala	Thr	1	5	10	15
10	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Ala	Ser	20	25	30	
15	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ala	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Arg	Trp	Thr	35	40	45	
20	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	50	55	60	
25	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	65	70	75	80
30	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	85	90	95	
35	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	100	105	110	
40	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	115	120	125	
45	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	130	135	140	
50	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	Leu	145	150	155	160
55	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn	165	170	175	
	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	180														
	<210>	10																		
	<211>	293																		
	<212>	BIJOK																		
	<213>	Homo sapiens																		
	<400>	10																		
60	Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Ala	Thr	1	5	10	15

	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Ala	Ser	
				20					25					30			
5	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ala	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Arg	Trp	Thr	
			35					40					45				
10	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	
		50					55					60					
15	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	
	65					70					75					80	
20	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	
					85					90					95		
25	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	
				100					105					110			
30	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	
			115					120					125				
35	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	
		130					135					140					
40	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	Leu	
	145					150					155					160	
45	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn	
					165					170					175		
50	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	Arg	
				180					185					190			
55	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	
			195					200					205				
60	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	
		210					215					220					
65	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Thr	Leu	
	225					230					235					240	
70	Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	His	Gly	
					245					250					255		

UA 130965 C2

	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	
				260					265					270			
5	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Thr	Gly	
			275					280					285				
10	Trp	Lys	Ile	His	Tyr												
		290															
	<210>	11															
	<211>	41															
15	<212>	БИЛОК															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	11															
20	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	
	1				5					10					15		
25	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	
				20					25					30			
30	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn	Lys								
			35					40									
	<210>	12															
	<211>	242															
	<212>	БИЛОК															
35	<213>	Homo sapiens															
	<400>	12															
40	Ile	Tyr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	
	1				5					10					15		
45	Leu	Ile	Leu	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Tyr	Asp	Asn	
				20					25					30			
50	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Gln	Lys	His	Asp	Ala	
			35					40					45				
55	Ser	Ala	Leu	Asp	Ile	Arg	Met	Gly	Thr	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	
		50					55					60					
60	Tyr	Thr	Gln	Ala	Trp	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	
	65					70					75					80	
65	His	Asp	Ala	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn	Asn	
					85					90					95		

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys
100 105 110

5
Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly
115 120 125

10
Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val
130 135 140

15
Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys
145 150 155 160

20
Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
165 170 175

25
Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala
180 185 190

30
Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile
195 200 205

35
Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
210 215 220

40
Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser
225 230 235 240

45
Asp Phe
<210> 13
<211> 16
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50
<220>
<223> Синтетична
<400> 13

55
Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

60
<210> 14
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Синтетична

<400> 14

5 Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
1 5 10 15

<210> 15
10 <211> 43
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> Синтетична

<400> 15

20 Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
20 25 30

25 Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
35 40

30 <210> 16
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Синтетична

<400> 16

40 Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

45 <210> 17
<211> 25
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> Синтетична

<400> 17

55 Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
1 5 10 15

60 Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична

 10 <400> 18

 Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
 1 5

 15
 <210> 19
 <211> 25
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 20
 <220>
 <223> Синтетична

 <400> 19
 25
 Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys
 1 5 10 15

 30 Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
 20 25

 <210> 20
 35 <211> 960
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 40 <220>
 <221> КП
 <222> (51)..(797)

 <400> 20
 45 attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56
 Met Ser
 1

 ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104
 50 Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser
 5 10 15

 tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152
 Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala
 55 20 25 30

 gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200
 Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
 35 40 45 50
 60
 ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248

UA 130965 C2

	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
					55					60					65		
5	aga	ggc	tta	cag	ggc	ccc	cct	gga	aag	ttg	ggg	cct	cca	gga	aat	cca	296
	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Asn	Pro	
				70					75					80			
10	ggg	cct	tct	ggg	tca	cca	gga	cca	aag	ggc	caa	aaa	gga	gac	cct	gga	344
	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	
			85					90					95				
15	aaa	agt	ccg	gat	ggc	gat	agt	agc	ctg	gct	gcc	tca	gaa	aga	aaa	gct	392
	Lys	Ser	Pro	Asp	Gly	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Glu	Arg	Lys	Ala	
		100					105					110					
20	ctg	caa	aca	gaa	atg	gca	cgt	atc	aaa	aag	tgg	ctc	acc	ttc	tct	ctg	440
	Leu	Gln	Thr	Glu	Met	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	Ser	Leu	
	115					120					125					130	
25	ggc	aaa	caa	gtt	ggg	aac	aag	ttc	ttc	ctg	acc	aat	ggc	gaa	ata	atg	488
	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Asn	Lys	Phe	Phe	Leu	Thr	Asn	Gly	Glu	Ile	Met	
					135					140					145		
30	acc	ttt	gaa	aaa	gtg	aag	gcc	ttg	tgt	gtc	aag	ttc	cag	gcc	tct	gtg	536
	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Cys	Val	Lys	Phe	Gln	Ala	Ser	Val	
				150					155					160			
35	gcc	acc	ccc	agg	aat	gct	gca	gag	aat	gga	gcc	att	cag	aat	ctc	atc	584
	Ala	Thr	Pro	Arg	Asn	Ala	Ala	Glu	Asn	Gly	Ala	Ile	Gln	Asn	Leu	Ile	
			165					170					175				
40	aag	gag	gaa	gcc	ttc	ctg	ggc	atc	act	gat	gag	aag	aca	gaa	ggg	cag	632
	Lys	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Glu	Lys	Thr	Glu	Gly	Gln	
		180					185					190					
45	ttt	gtg	gat	ctg	aca	gga	aat	aga	ctg	acc	tac	aca	aac	tgg	aac	gag	680
	Phe	Val	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Leu	Thr	Tyr	Thr	Asn	Trp	Asn	Glu	
	195					200					205					210	
50	ggc	gaa	ccc	aac	aat	gct	ggc	tct	gat	gaa	gat	tgt	gta	ttg	cta	ctg	728
	Gly	Glu	Pro	Asn	Asn	Ala	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	
					215					220				225			
55	aaa	aat	ggc	cag	tgg	aat	gac	gtc	ccc	tgc	tcc	acc	tcc	cat	ctg	gcc	776
	Lys	Asn	Gly	Gln	Trp	Asn	Asp	Val	Pro	Cys	Ser	Thr	Ser	His	Leu	Ala	
				230					235					240			
60	gtc	tgt	gag	ttc	cct	atc	tga	aggg	tcata	cactcaggcc	ctcctt	gtct					827
	Val	Cys	Glu	Phe	Pro	Ile											
			245														
65	ttttactgca	acccacaggc	ccacagtatg	cttgaaaaga	taaattatat	caatttcctc											887
70	atatccagta	ttgttccttt	tgtgggcaat	cactaaaaat	gataccta	agcaccaaca											947
75	aagcaataat	agt															960
80	<210>	21															
85	<211>	248															
90	<212>	БИЛОК															

<213> Homo sapiens

<400> 21

5	Met	Ser	Leu	Phe	Pro	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Val	Ala	1	5	10	15
10	Ala	Ser	Tyr	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Glu	Asp	Ala	Gln	Lys	Thr	Cys	20	25	30	
15	Pro	Ala	Val	Ile	Ala	Cys	Ser	Ser	Pro	Gly	Ile	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	35	40	45	
20	Lys	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Gln	50	55	60	
25	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	65	70	75	80
30	Asn	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Asp	85	90	95	
35	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Asp	Gly	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Glu	Arg	100	105	110	
40	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Glu	Met	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	115	120	125	
45	Ser	Leu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Asn	Lys	Phe	Phe	Leu	Thr	Asn	Gly	Glu	130	135	140	
50	Ile	Met	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Cys	Val	Lys	Phe	Gln	Ala	145	150	155	160
55	Ser	Val	Ala	Thr	Pro	Arg	Asn	Ala	Ala	Glu	Asn	Gly	Ala	Ile	Gln	Asn	165	170	175	
60	Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Glu	Lys	Thr	Glu	180	185	190	
	Gly	Gln	Phe	Val	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Leu	Thr	Tyr	Thr	Asn	Trp	195	200	205	
	Asn	Glu	Gly	Glu	Pro	Asn	Asn	Ala	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Cys	Val	Leu	210	215	220	
	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Gln	Trp	Asn	Asp	Val	Pro	Cys	Ser	Thr	Ser	His				

	225	230	235	240
5	Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile	245		
10	<210> 22 <211> 6 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність			
15	<220> <223> Синтетична			
20	<220> <221> ІНША ОЗНАКА <222> (1)..(1) <223> При цьому X в положенні 1 являє собою гідроксипролін			
25	<220> <221> ІНША ОЗНАКА <222> (4)..(4) <223> При цьому X в положенні 4 являє собою гідрофобний залишок			
30	<400> 22 Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro 1 5			
35	<210> 23 <211> 5 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність			
40	<220> <223> Синтетична			
45	<220> <221> ІНША ОЗНАКА <222> (1)..(1) <223> При цьому X являє собою гідроксипролін			
50	<400> 23 Xaa Gly Lys Leu Gly 1 5			
55	<210> 24 <211> 16 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність			
60	<220> <223> Синтетична			

<220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (9)..(15)
 <223> При цьому X в положеннях 9 і 15 являє собою гідроксипролін
 5
 <400> 24

 Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly
 1 5 10 15
 10

 <210> 25
 <211> 27
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична
 20

 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (3)..(27)
 <223> При цьому X в положеннях 3, 6, 15, 21, 24, 27 являє собою
 25 гідроксипролін

 <400> 25

 Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly
 1 5 10 15
 30

 Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
 20 25
 35

 <210> 26
 <211> 53
 <212> БІЛОК
 40 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична
 45

 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (26)..(26)
 <223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою
 50

 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (32)..(32)
 <223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою
 55

 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (35)..(35)
 <223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою
 60

 <220>

<221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (41)..(41)
 <223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою
 5 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (50)..(50)
 <223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою
 10 <400> 26
 Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa
 20 25 30
 20 Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
 35 40 45
 Asp Xaa Gly Lys Ser
 25 50
 <210> 27
 <211> 33
 30 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична
 35
 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (3)..(33)
 40 <223> При цьому X в положеннях 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 являє собою
 гідроксипролін
 <400> 27
 45 Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
 1 5 10 15
 Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
 50 20 25 30
 Xaa
 55
 <210> 28
 <211> 45
 <212> БІЛОК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична

5 <220>
<221> ІНША ОЗНАКА
<222> (3) .. (45)
<223> При цьому X в положеннях 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 являє собою гідроксипролін

10 <400> 28

Gly Cys Xaa Gly Leu Xaa Gly Ala Xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly
1 5 10 15

15 Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys
20 25 30

20 Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa
35 40 45

25 <210> 29
<211> 24
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> Синтетична
<400> 29

35 Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala
1 5 10 15

40 Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile
20

45 <210> 30
<211> 559
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 30
atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttggggcccg 60
50 aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120
aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcaccccccg gctaccgcct gcgcctctac 180
55 ttcaccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240
tcggggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcggggc 300
cctggcaagg acactttcta ctgcgtgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360
60 tactccaacg agaagccgtt cacgggggtc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420

	gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg	480
5	ggcggtttct actgctcctg ccgcgagggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc	540
	tcagccctgt gctccggcc	559
10	<210> 31 <211> 34 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
15	<220> <223> Синтетична	
	<400> 31 cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc	34
20	<210> 32 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Синтетична	
30	<400> 32 gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag	33
35	<210> 33 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> Синтетична	
	<400> 33 agcagccctg aataccsacg gccgtatccc aaa	33
45	<210> 34 <211> 26 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
50	<220> <223> Синтетична	
55	<400> 34 cgggatccat gaggtgctg accctc	26
60	<210> 35 <211> 19 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	

	<220>		
	<223>	Синтетична	
	<400>	35	
5	ggaattccta	ggctgcata	19
	<210>	36	
	<211>	19	
10	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Синтетична	
15	<400>	36	
	ggaattccta	cagggcgct	19
	<210>	37	
20	<211>	19	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Синтетична	
	<400>	37	
30	ggaattccta	gtagtggat	19
	<210>	38	
	<211>	25	
	<212>	ДНК	
35	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Синтетична	
40	<400>	38	
	tgcggccgct	gtaggtgctg tcttt	25
	<210>	39	
45	<211>	23	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
50	<223>	Синтетична	
	<400>	39	
	ggaattcact	cggtattctc gga	23
55	<210>	40	
	<211>	17	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
60	<220>		

	<223> Синтетична	
5	<400> 40 tccgagaata acgagtg	17
10	<210> 41 <211> 29 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
15	<220> <223> Синтетична <400> 41 cattgaaagc tttggggtag aagttgttc	29
20	<210> 42 <211> 27 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Синтетична <400> 42 cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga	27
30	<210> 43 <211> 28 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
35	<220> <223> Синтетична <400> 43 cggtaagctt cactgggtca gggaaata	28
45	<210> 44 <211> 37 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
50	<220> <223> Синтетична <400> 44 aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact	37
55	<210> 45 <211> 31 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
60	<220> <223> Синтетична	

	<400> 45	
	cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g	31
5		
	<210> 46	
	<211> 36	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
10		
	<220>	
	<223> Синтетична	
	<400> 46	
15	aagaaagctt gccgccacca tggtctcact agctct	36
	<210> 47	
	<211> 26	
20	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетична	
25		
	<400> 47	
	cgggatcctt ctccctctaa cactct	26
30	<210> 48	
	<211> 9	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Синтетична	
	<400> 48	
40	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	
	1 5	
	<210> 49	
45	<211> 4960	
	<212> ДНК	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 49	
50	ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt	60
	gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag	120
	gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagggg	180
55	gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac	240
	aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga	300
60	agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt	360

	tttttttttt	tttgaggtgg	agtctcactc	tgtcgtccag	gctggagtgc	agtgggtgcga	420
	tctcggatca	ctgcaacctc	cgccctcccag	gctcaagcaa	ttctcctgcc	tcagcctccc	480
5	gagtagctgg	gattataagt	gcgcgctgcc	acacctggat	gattttttgta	tttttagtag	540
	agatgggatt	tcaccatggt	ggtcaggctg	gtctcaaact	cccaacctcg	tgatccaccc	600
10	accttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggtataagcc	accgagccca	gccaaaagcg	660
	acttctaagc	ctgcaaggga	atcgggaatt	ggtggcacca	ggtccttctg	acagggttta	720
	agaaattagc	cagcctgagg	ctgggcacgg	tggctcacac	ctgtaatccc	agcactttgg	780
15	gaggctaagg	caggtggatc	acctgagggc	aggagttcaa	gaccagcctg	accaacatgg	840
	agaaacccca	tccctaccaa	aaataaaaaa	ttagccaggt	gtggtggtgc	tcgcctgtaa	900
20	tcccagctac	ttgggaggct	gaggtgggag	gattgcttga	acacaggaag	tagaggctgc	960
	agtgagctat	gattgcagca	ctgcactgaa	gccggggcaa	cagaacaaga	tccaaaaaaa	1020
	agggaggggt	gaggggcaga	gccaggatth	gtttccaggc	tgttgttacc	taggtccgac	1080
25	tcctggctcc	cagagcagcc	tgtcctgcct	gcctggaact	ctgagcaggc	tggagtcatg	1140
	gagtcgattc	ccagaatccc	agagtcaggg	aggctggggg	caggggcagg	tcactggaca	1200
30	aacagatcaa	aggtgagacc	agcgtagggc	tgagaccag	gccaggccag	ctggacgggc	1260
	acaccatgag	gtaggtgggc	gccacagcc	tccctgcagg	gtgtgggggtg	ggagcacagg	1320
	cctggggcct	caccgccct	gccctgccca	taggctgctg	accctcctgg	gccttctgtg	1380
35	tggctcggtg	gccaccccct	tggggccgaa	gtggcctgaa	cctgtgttcg	ggcgctggc	1440
	atcccccggc	tttccagggg	agtatgcaa	tgaccaggag	cggcgctgga	ccctgactgc	1500
40	accccccggc	taccgcctgc	gcctctactt	caccacttc	gacctggagc	tctcccacct	1560
	ctgcgagtac	gacttcgtca	aggtgccgtc	aggacgggag	ggctgggggtt	tctcagggtc	1620
	gggggggtccc	caaggagtag	ccagggttca	gggacacctg	ggagcagggg	ccaggcttgg	1680
45	ccaggaggga	gatcaggcct	gggtcttgcc	ttactccct	gtgacacctg	acccacagc	1740
	tgagctcggg	ggccaagggtg	ctggccacgc	tgtgcgggca	ggagagcaca	gacacggagc	1800
50	ggggccctgg	caaggacact	ttctactcgc	tgggctccag	cctggacatt	accttcgct	1860
	ccgactactc	caacgagaag	ccgttcacgg	ggttcgaggc	cttctatgca	gccgaggggtg	1920
	agccaagagg	ggtcctgcaa	catctcagtc	tgcgagctg	gctgtggggg	taactctgtc	1980
55	ttaggccagg	cagccctgcc	ttcagtttcc	ccacctttcc	cagggcaggg	gagaggcctc	2040
	tggcctgaca	tcattccaaa	tgcaaagacc	aaaacagccg	tgacctccat	tcacatgggc	2100
60	tgagtgccaa	ctctgagcca	gggatctgag	gacagcatcg	cctcaagtga	cgcagggact	2160
	ggccggggcg	agcagctcac	gcctgtaatt	ccagcacttt	gggaggccga	ggctggctga	2220

	tcatttgagg	tcaggagttc	aaggccagcc	agggcaacac	ggtgaaactc	tatctccact	2280
5	aaaactacaa	aaattagctg	ggcgtggtgg	tgcgcacctg	gaatcccagc	tactagggag	2340
	gctgaggcag	gagaattgct	tgaacctgcg	aggtggaggc	tgcaagtgaac	agagattgca	2400
	ccactacact	ccagcctggg	cgacagagct	agactccgtc	tcaaaaaaca	aaaaacaaaa	2460
10	acgacgcagg	ggccgagggc	cccatttaca	gctgacaaaag	tggggccctg	ccagcgggag	2520
	cgctgccagg	atgtttgatt	tcagatccca	gtccctgcag	agaccaactg	tgtgacctct	2580
	ggcaagtggc	tcaattttctc	tgctccttag	gaagctgctg	caagggttca	gcgctgtagc	2640
15	cccgcccccct	gggtttgatt	gactcccctc	attagctggg	tgacctcggg	ccggacactg	2700
	aaactcccac	tggtttaaca	gaggtgatgt	ttgcatcttt	ctcccagcgc	tgctgggagc	2760
20	ttgcagcgac	cctaggcctg	taaggtgatt	ggcccggcac	cagtcccgca	ccctagacag	2820
	gacgaggcct	cctctgaggt	ccactctgag	gtcatggatc	tcctgggagg	agtccaggct	2880
	ggatcccgcc	tctttccctc	ctgacggcct	gcctggccct	gcctctcccc	cagacattga	2940
25	cgagtgccag	gtggccccgg	gagaggcgcc	cacctgcgac	caccactgcc	acaaccacct	3000
	gggcgggtttc	tactgctcct	gccgcgcagg	ctacgtcctg	caccgtaaca	agcgcacctg	3060
30	ctcagccctg	tgctccggcc	aggtcttcac	ccagaggtct	ggggagctca	gcagccctga	3120
	atacccacgg	ccgtatccca	aactctccag	ttgcacttac	agcatcagcc	tggaggaggg	3180
	gttcagtgtc	attctggact	ttgtggagtc	cttcgatgtg	gagacacacc	ctgaaaccct	3240
35	gtgtccctac	gacttttctc	agattcaaac	agacagagaa	gaacatggcc	cattctgtgg	3300
	gaagacattg	ccccacagga	ttgaaacaaa	aagcaacacg	gtgaccatca	cctttgtcac	3360
40	agatgaatca	ggagaccaca	caggctggaa	gatccactac	acgagcacag	cgcacgcttg	3420
	cccttatccg	atggcgccac	ctaattggcca	cgtttcacct	gtgcaagcca	aatacatcct	3480
	gaaagacagc	ttctccatct	tttgcgagac	tggctatgag	cttctgcaag	gtcacttgcc	3540
45	cctgaaatcc	tttactgcag	tttgtcagaa	agatggatct	tgggaccggc	caatgccgcg	3600
	gtgcagcatt	gttgactgtg	gccctcctga	tgatctaccc	agtggccgag	tggagtacat	3660
50	cacaggtcct	ggagtgacca	cctacaaagc	tgtgattcag	tacagctgtg	aagagacctt	3720
	ctacacaatg	aaagtgaatg	atggtaaata	tgtgtgtgag	gctgatggat	tctggacgag	3780
	ctccaaagga	gaaaaatcac	tcccagtctg	tgagcctgtt	tgtggactat	cagcccgcac	3840
55	aacaggaggg	cgtatatatg	gagggcaaaa	ggcaaaacct	ggtgattttc	cttggcaagt	3900
	cctgatatta	ggtggaacca	cagcagcagg	tgacttttta	tatgacaact	gggtcctaac	3960
60	agctgctcat	gccgtctatg	agcaaaaaaca	tgatgcatcc	gccctggaca	ttcgaatggg	4020

	caccctgaaa agactatcac ctcattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca	4080
	tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa	4140
5	caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc	4200
	ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt	4260
10	tcttgctaga aatctaattgt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc	4320
	tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgttaact gctaacatgc tttgtgctgg	4380
	cttagaaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggagggggcac tgggtgtttct	4440
15	agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcttgggggtt ccatgaattg	4500
	tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatatcc cctggatcga	4560
20	gaacataatt agtgatTTTT aacttgctgt tctgcagtca aggattcttc attttttagaa	4620
	atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca	4680
	tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca	4740
25	cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga	4800
	cagtcattct tgcccacca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttaccttaaa	4860
30	aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt	4920
	tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa	4960
35	<210> 50 <211> 2090 <212> ДНК <213> Миша	
40	<220> <221> КП <222> (33) .. (2090)	
45	<400> 50 ggcgtggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu 1 5	53
50	ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro 10 15 20	101
55	gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr 25 30 35	149
60	gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr 40 45 50 55	197
	cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc	245

UA 130965 C2

	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	
					60					65					70		
5	tgc	gag	tat	gac	ttt	gtc	aag	ttg	agc	tca	ggg	acc	aag	gtg	ctg	gcc	293
	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	
				75					80					85			
10	aca	ctg	tgt	ggg	cag	gag	agt	aca	gac	act	gag	cag	gca	cct	ggc	aat	341
	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	
			90					95					100				
15	gac	acc	ttc	tac	tca	ctg	ggg	ccc	agc	cta	aag	gtc	acc	ttc	cac	tcc	389
	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	
		105					110					115					
20	gac	tac	tcc	aat	gag	aag	ccg	ttc	aca	ggg	ttt	gag	gcc	ttc	tat	gca	437
	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	
	120					125					130					135	
25	gag	gag	gat	gtg	gat	gaa	tgc	aga	gtg	tct	ctg	gga	gac	tca	gtc	cct	485
	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	
					140					145					150		
30	tgt	gac	cat	tat	tgc	cac	aac	tac	ttg	ggc	ggc	tac	tat	tgc	tcc	tgc	533
	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	
				155					160					165			
35	aga	gag	ggc	tac	att	ctc	cac	cag	aac	aag	cac	acg	tgc	tca	gcc	ctt	581
	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	
			170					175					180				
40	tgt	tca	ggc	cag	gtg	ttc	aca	gga	aga	tct	ggg	tat	ctc	agt	agc	cct	629
	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro	
		185					190					195					
45	gag	tac	ccg	cag	cca	tac	ccc	aag	ctc	tcc	agc	tgc	acc	tac	agc	atc	677
	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	
	200					205					210					215	
50	cgc	ctg	gag	gac	ggc	ttc	agt	gtc	atc	ctg	gac	ttc	gtg	gag	tcc	ttc	725
	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	
				220						225				230			
55	gat	gtg	gag	acg	cac	cct	gaa	gcc	cag	tgc	ccc	tat	gac	tcc	ctc	aag	773
	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	
				235					240					245			
60	att	caa	aca	gac	aag	ggg	gaa	cac	ggc	cca	ttt	tgt	ggg	aag	acg	ctg	821
	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	
			250					255					260				
65	cct	ccc	agg	att	gaa	act	gac	agc	cac	aag	gtg	acc	atc	acc	ttt	gcc	869
	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	His	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala	
			265				270					275					
70	act	gac	gag	tcg	ggg	aac	cac	aca	ggc	tgg	aag	ata	cac	tac	aca	agc	917
	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	
	280					285					290					295	
75	aca	gca	cgg	ccc	tgc	cct	gat	cca	acg	gag	cca	cct	aat	ggc	agc	att	965
	Thr	Ala	Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	

UA 130965 C2

	300								305				310				
5	tca	cct	gtg	caa	gcc	acg	tat	gtc	ctg	aag	gac	agg	ttt	tct	gtc	ttc	1013
	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe	
				315					320					325			
10	tgc	aag	aca	ggc	ttc	gag	ctt	ctg	caa	ggg	tct	gtc	ccc	ctg	aaa	tca	1061
	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	
			330					335					340				
15	ttc	act	gct	gtc	tgt	cag	aaa	gat	gga	tct	tgg	gac	cgg	ccg	atg	cca	1109
	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	
		345					350					355					
20	gag	tgc	agc	att	att	gat	tgt	ggc	cct	ccc	gat	gac	cta	ccc	aat	ggc	1157
	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly	Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	
	360					365					370					375	
25	cat	gtg	gac	tat	atc	aca	ggc	cct	caa	gtg	act	acc	tac	aaa	gct	gtg	1205
	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	
				380						385					390		
30	att	cag	tac	agc	tgt	gaa	gag	act	ttc	tac	aca	atg	agc	agc	aat	ggc	1253
	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	
				395				400						405			
35	aaa	tat	gtg	tgt	gag	gct	gat	gga	ttc	tgg	acg	agc	tcc	aaa	gga	gaa	1301
	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	
			410					415					420				
40	aaa	ctc	ccc	ccg	gtt	tgt	gag	cct	gtt	tgt	ggg	ctg	tcc	aca	cac	act	1349
	Lys	Leu	Pro	Pro	Val	Cys	Glu	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	
		425					430					435					
45	ata	gga	gga	cgc	ata	gtt	gga	ggg	cag	cct	gca	aag	cct	ggg	gac	ttt	1397
	Ile	Gly	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	
	440					445					450					455	
50	cct	tgg	caa	gtc	ttg	ttg	ctg	ggg	caa	act	aca	gca	gca	gca	ggg	gca	1445
	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	
				460						465					470		
55	ctt	ata	cat	gac	aat	tgg	gtc	cta	aca	gcc	gct	cat	gct	gta	tat	gag	1493
	Leu	Ile	His	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	
				475				480						485			
60	aaa	aga	atg	gca	gcg	tcc	tcc	ctg	aac	atc	cga	atg	ggc	atc	ctc	aaa	1541
	Lys	Arg	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	
			490					495					500				
65	agg	ctc	tca	cct	cat	tac	act	caa	gcc	tgg	ccc	gag	gaa	atc	ttt	ata	1589
	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Glu	Ile	Phe	Ile	
		505					510					515					
70	cat	gaa	ggc	tac	act	cac	ggg	gct	ggg	ttt	gac	aat	gat	ata	gca	ttg	1637
	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	
	520					525					530					535	
75	att	aaa	ctc	aag	aac	aaa	gtc	aca	atc	aac	gga	agc	atc	atg	cct	gtt	1685
	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Met	Pro	Val	
					540					545					550		

	tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act	1733
	Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr	
	555 560 565	
5		
	gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga	1781
	Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg	
	570 575 580	
10		
	aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc	1829
	Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr	
	585 590 595	
15		
	acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg	1877
	Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met	
	600 605 610 615	
20		
	ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac	1925
	Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp	
	620 625 630	
25		
	agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt	1973
	Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe	
	635 640 645	
30		
	gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc	2021
	Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly	
	650 655 660	
35		
	cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag	2069
	Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu	
	665 670 675	
40		
	aac ata ata agt aat ttc taa	2090
	Asn Ile Ile Ser Asn Phe	
	680 685	
45		
	<210> 51	
	<211> 685	
	<212> БІЛОК	
	<213> Миша	
	<400> 51	
50		
	Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr	
	1 5 10 15	
55		
	Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser	
	20 25 30	
60		
	Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr	
	35 40 45	
	Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe	
	50 55 60	

UA 130965 C2

	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	65	70	75	80
5	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	85	90	95	
10	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	100	105	110	
15	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	115	120	125	
20	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Val	130	135	140	
25	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu	145	150	155	160
30	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn	165	170	175	
35	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg	180	185	190	
40	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	195	200	205	
45	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	210	215	220	
50	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	Gln	225	230	235	240
55	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	Gly	245	250	255	
60	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	His	260	265	270	
	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly	275	280	285	
	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	290	295	300	
	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu				

UA 130965 C2

	305				310					315					320	
5	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln
					325					330					335	
10	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly
				340					345					350		
15	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly	Pro
			355					360					365			
20	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln
		370					375					380				
25	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe
	385					390					395					400
30	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Phe
				405					410						415	
35	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu	Pro	Pro	Val	Cys	Glu	Pro	Val
			420					425						430		
40	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln
		435						440					445			
45	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln
		450					455					460				
50	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	Thr
	465					470					475					480
55	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Lys	Arg	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn
				485						490					495	
60	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	Ala
			500					505						510		
65	Trp	Pro	Glu	Glu	Ile	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	Gly
		515						520					525			
70	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	Ile
		530					535					540				
75	Asn	Gly	Ser	Ile	Met	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser
	545					550					555					560

5 Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
 565 570 575
 10 Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
 580 585 590
 15 Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly
 595 600 605
 20 Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly
 610 615 620
 25 Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
 625 630 635
 30 Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
 645 650 655
 35 Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
 660 665 670
 40 Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
 675 680 685
 45 <210> 52
 <211> 670
 <212> БИЛОК
 <213> Миша
 50 <400> 52
 Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
 1 5 10 15
 55 Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp
 20 25 30
 60 Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45
 Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

UA 130965 C2

	Asp	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	85	90	95
5	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	100	105	110
10	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	115	120	125
15	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	130	135	140
20	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	145	150	155
	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	165	170	175
25	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	180	185	190
30	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Phe	Ser	Val	195	200	205
35	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	210	215	220
40	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	225	230	235
	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	245	250	255
45	His	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	260	265	270
50	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	275	280	285
55	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	290	295	300
60	Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	305	310	315
	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp			

UA 130965 C2

				325					330					335			
5	Gly	Ser	Trp	Asp 340	Arg	Pro	Met	Pro	Glu 345	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp 350	Cys	Gly	
10	Pro	Pro	Asp 355	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly 360	His	Val	Asp	Tyr	Ile 365	Thr	Gly	Pro	
15	Gln	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala 375	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	
			370									380					
	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly 400	
	385					390					395						
20	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu	Pro	Pro	Val	Cys	Glu	Pro	
				405						410					415		
25	Val	Cys	Gly	Leu 420	Ser	Thr	His	Thr	Ile 425	Gly	Gly	Arg	Ile	Val 430	Gly	Gly	
30	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	
			435					440					445				
	Gln	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	
	450						455					460					
35	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Lys	Arg	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	
	465					470					475					480	
40	Asn	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	
					485					490					495		
45	Ala	Trp	Pro	Glu	Glu	Ile	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	
				500					505					510			
50	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	
			515					520					525				
	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Met	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	
	530						535					540					
55	Ser	Leu	Met	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	
	545					550					555					560	
60	Thr	Gln	Lys	Gly	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	
					565					570					575		

	Ile	Ala	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Thr	Thr	Val	Tyr	Glu	Lys	Leu	Tyr	Pro	
				580					585					590			
5																	
	Gly	Val	Arg	Val	Ser	Ala	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Leu	Glu	Thr	Gly	
			595					600					605				
10																	
	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	
		610					615					620					
15																	
	Asp	Asn	Glu	Thr	Gln	Arg	Trp	Phe	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
	625					630					635					640	
20																	
	Ser	Ile	Asn	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	
					645					650					655		
25																	
	Ile	Asn	Tyr	Ile	Pro	Trp	Asn	Glu	Asn	Ile	Ile	Ser	Asn	Phe			
				660					665					670			
30																	
	<210>	53															
	<211>	2091															
	<212>	ДНК															
	<213>	Шты															
35																	
	<220>																
	<221>	КП															
	<222>	(10) .. (2067)															
40																	
	<400>	53															
	tggcacaca	atg	agg	cta	ctg	atc	gtc	ctg	ggt	ctg	ctt	tgg	agt	ttg	gtg		51
		Met	Arg	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Leu	Trp	Ser	Leu	Val			
		1				5					10						
45																	
	gcc	aca	ctt	ttg	ggc	tcc	aag	tgg	cct	gag	cct	gta	ttc	ggg	cgc	ctg	99
	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	
	15					20					25				30		
50																	
	gtg	tcc	ctg	gcc	ttc	cca	gag	aag	tat	ggc	aac	cat	cag	gat	cga	tcc	147
	Val	Ser	Leu	Ala	Phe	Pro	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asn	His	Gln	Asp	Arg	Ser	
				35						40					45		
55																	
	tgg	acg	ctg	act	gca	ccc	cct	ggc	ttc	cgc	ctg	cgc	ctc	tac	ttc	acc	195
	Trp	Thr	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	
				50					55					60			
60																	
	cac	ttc	aac	ctg	gaa	ctc	tct	tac	cgc	tgc	gag	tat	gac	ttt	gtc	aag	243
	His	Phe	Asn	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	
			65					70					75				
65																	
	ttg	acc	tca	ggg	acc	aag	gtg	cta	gcc	acg	ctg	tgt	ggg	cag	gag	agt	291
	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	
		80					85					90					

	aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt	339
	Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly	
	95 100 105 110	
5	ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca	387
	Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro	
	115 120 125	
10	ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc	435
	Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys	
	130 135 140	
15	aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac	483
	Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn	
	145 150 155	
20	tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac	531
	Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His	
	160 165 170	
	cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act	579
	Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr	
	175 180 185 190	
25	ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc	627
	Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro	
	195 200 205	
30	aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt	675
	Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser	
	210 215 220	
35	atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa	723
	Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu	
	225 230 235	
40	gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa	771
	Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu	
	240 245 250	
	tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac	819
	Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp	
	255 260 265 270	
45	agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac	867
	Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His	
	275 280 285	
50	aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat	915
	Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp	
	290 295 300	
55	cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat	963
	Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr	
	305 310 315	
60	gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011
	Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu	
	320 325 330	
	ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa	1059

UA 130965 C2

	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	
	335					340					345					350	
5	gat	gga	tct	tgg	gac	cgg	ccg	ata	cca	gag	tgc	agc	att	att	gac	tgt	1107
	Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Ile	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	
					355					360					365		
10	ggc	cct	ccc	gat	gac	cta	ccc	aat	ggc	cac	gtg	gac	tat	atc	aca	ggc	1155
	Gly	Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	
				370					375					380			
15	cct	gaa	gtg	acc	acc	tac	aaa	gct	gtg	att	cag	tac	agc	tgt	gaa	gag	1203
	Pro	Glu	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	
			385					390					395				
20	act	ttc	tac	aca	atg	agc	agc	aat	ggc	aaa	tat	gtg	tgt	gag	gct	gat	1251
	Thr	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	
		400					405					410					
25	gga	ttc	tgg	acg	agc	tcc	aaa	gga	gaa	aaa	tcc	ctc	ccg	ggt	tgc	aag	1299
	Gly	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Lys	
	415					420				425					430		
30	cct	gtc	tgt	gga	ctg	tcc	aca	cac	act	tca	gga	ggc	cgt	ata	att	gga	1347
	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	
				435					440					445			
35	gga	cag	cct	gca	aag	cct	ggc	gac	ttt	cct	tgg	caa	gtc	ttg	tta	ctg	1395
	Gly	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	
			450					455					460				
40	ggt	gaa	act	aca	gca	gca	ggc	gct	ctt	ata	cat	gac	gac	tgg	gtc	cta	1443
	Gly	Glu	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Trp	Val	Leu	
			465				470					475					
45	aca	gcg	gct	cat	gct	gta	tat	ggg	aaa	aca	gag	gcg	atg	tcc	tcc	ctg	1491
	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Glu	Ala	Met	Ser	Ser	Leu	
		480				485					490						
50	gac	atc	cgc	atg	ggc	atc	ctc	aaa	agg	ctc	tcc	ctc	att	tac	act	caa	1539
	Asp	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Thr	Gln	
	495				500				505							510	
55	gcc	tgg	cca	gag	gct	gtc	ttt	atc	cat	gaa	ggc	tac	act	cac	gga	gct	1587
	Ala	Trp	Pro	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	
				515					520						525		
60	ggt	ttt	gac	aat	gat	ata	gca	ctg	att	aaa	ctc	aag	aac	aaa	gtc	aca	1635
	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	
			530					535					540				
65	atc	aac	aga	aac	atc	atg	ccg	att	tgt	cta	cca	aga	aaa	gaa	gct	gca	1683
	Ile	Asn	Arg	Asn	Ile	Met	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	
			545				550						555				
70	tcc	tta	atg	aaa	aca	gac	ttc	gtt	gga	act	gtg	gct	ggc	tgg	ggg	tta	1731
	Ser	Leu	Met	Lys	Thr	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	
		560				565						570					
75	acc	cag	aag	ggg	ttt	ctt	gct	aga	aac	cta	atg	ttt	gtg	gac	ata	cca	1779
	Thr	Gln	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	

UA 130965 C2

	575		580		585		590		
	att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac							1827	
5	Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr		595		600		605		
	cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc							1875	
10	Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg		610		615		620		
	ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt							1923	
	Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe		625		630		635		
15	cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg							1971	
	Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp		640		645		650		
	ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa							2019	
20	Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys		655		660		665		670
	gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa							2067	
25	Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe		675		680		685		
	tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa							2091	
30	<210> 54								
	<211> 685								
	<212> БИЛОК								
	<213> Илп								
35	<400> 54								
	Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr								
	1 5 10 15								
40	Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser								
	20 25 30								
45	Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr								
	35 40 45								
50	Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe								
	50 55 60								
55	Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr								
	65 70 75 80								
	Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp								
	85 90 95								
60	Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser								

UA 130965 C2

5	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr
			115					120					125			
10	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr
		130					135					140				
15	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu
	145					150					155					160
	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn
					165					170					175	
20	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg
				180					185						190	
25	Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu
			195					200					205			
30	Ser	Ser	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr
		210					215					220				
	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Met	His	Pro	Glu	Ala	Gln
	225					230					235					240
35																
	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Arg	Glu	Tyr	Gly
					245					250					255	
40	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	Asn
				260					265					270		
45	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly
			275					280					285			
50	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr
		290					295					300				
	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu
	305					310					315					320
55																
	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln
					325					330					335	
60	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly
				340					345					350		

5	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Ile	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly	Pro	355	360	365
10	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	370	375	380
15	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	385	390	395
20	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Phe	405	410	415
25	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Lys	Pro	Val	420	425	430
30	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Gln	435	440	445
35	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	450	455	460
40	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	465	470	475
45	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Glu	Ala	Met	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	485	490	495
50	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Thr	Gln	Ala	Trp	500	505	510
55	Pro	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	Gly	Phe	515	520	525
60	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	Asn	530	535	540
65	Arg	Asn	Ile	Met	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	Leu	545	550	555
70	Met	Lys	Thr	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	Thr	Gln	565	570	575
75	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	Ile	Val	580	585	590

	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Ala	Thr	Ala	Tyr	Thr	Lys	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gly	
			595					600					605				
5	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Leu	Asp	Arg	Gly	Gly	
		610					615					620					
10	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	
	625					630					635					640	
15	Asn	Glu	Thr	Gln	Arg	Trp	Phe	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	
					645					650					655		
20	Ile	Asn	Cys	Gly	Gly	Ser	Glu	Gln	Tyr	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	
				660					665					670			
25	Asn	Tyr	Ile	Pro	Trp	Ile	Glu	Asn	Ile	Ile	Asn	Asn	Phe				
			675					680					685				
30	<210>	55															
	<211>	670															
	<212>	BIJOK															
	<213>	Илп															
35	<400>	55															
	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Val	
	1				5					10					15		
40	Ser	Leu	Ala	Phe	Pro	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asn	His	Gln	Asp	Arg	Ser	Trp	
			20						25					30			
45	Thr	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	
			35					40					45				
50	Phe	Asn	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	
	50						55					60					
55	Thr	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	
	65					70					75					80	
60	Asp	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	
					85					90					95		
65	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	
				100					105					110			
70	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	

UA 130965 C2

5	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr
	130						135					140				
10	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln
	145					150					155					160
	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly
					165					170					175	
15																
	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys
				180					185					190		
20	Leu	Ser	Ser	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Ile
			195					200					205			
25	Thr	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Met	His	Pro	Glu	Ala
	210						215					220				
	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Arg	Glu	Tyr
30	225					230					235					240
	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser
					245					250					255	
35																
	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr
				260					265					270		
40	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro
			275					280					285			
	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val
45	290					295						300				
	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu
50	305					310					315					320
	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp
					325					330					335	
55																
	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Ile	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly
				340					345					350		
60	Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro
			355					360					365			

	Glu	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	
		370					375					380					
5																	
	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
10																	
	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Lys	Pro	
					405					410					415		
15																	
	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	
				420					425					430			
20																	
	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	
			435					440					445				
25																	
	Glu	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Trp	Val	Leu	Thr	
		450					455					460					
30																	
	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Glu	Ala	Met	Ser	Ser	Leu	Asp	
	465					470					475					480	
35																	
	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Thr	Gln	Ala	
					485					490					495		
40																	
	Trp	Pro	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	Gly	
				500					505					510			
45																	
	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	
			515					520					525				
50																	
	Asn	Arg	Asn	Ile	Met	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	
		530					535					540					
55																	
	Leu	Met	Lys	Thr	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	Thr	
	545					550					555					560	
60																	
	Gln	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	Ile	
					565					570					575		
65																	
	Val	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Ala	Thr	Ala	Tyr	Thr	Lys	Gln	Pro	Tyr	Pro	
				580					585					590			
70																	
	Gly	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Leu	Asp	Arg	Gly	
			595					600					605				

	Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu	
	610 615 620	
5	Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly	
	625 630 635 640	
10	Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val	
	645 650 655	
15	Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe	
	660 665 670	
	<210> 56	
	<211> 28	
20	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Homo Sapiens	
25	<400> 56	
	atgaggctgc tgaccctcct gggccttc	28
30	<210> 57	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Homo Sapiens	
	<400> 57	
	gtgcccctcc tgcgtcacct ctg	23
40	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
45	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Homo Sapiens	
50	<400> 58	
	cagaggtgac gcagdagggg cac	23
	<210> 59	
55	<211> 27	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
60	<223> Homo Sapiens	

	<400> 59	
	ttaaaaatcac taattatggt ctcgatc	27
5	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
10	<220>	
	<223> Миша	
	<400> 60	
15	atgaggctac tcattcttcct gg	22
	<210> 61	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
20	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Миша	
25	<400> 61	
	ctgcaagagt gacgagggg ggg	23
	<210> 62	
30	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
35	<223> Миша	
	<400> 62	
	ccccccctgc gtcacctctg cag	23
40	<210> 63	
	<211> 29	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
45	<220>	
	<223> Миша	
	<400> 63	
50	ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc	29
	<210> 64	
	<211> 29	
55	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Щур	
60	<400> 64	

	gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt	29
5	<210> 65 <211> 37 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Щур	
	<400> 65 ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca	37
15	<210> 66 <211> 354 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> Синтетична	
25	<400> 66 caggtcacct tgaaggagtc tggctctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg	60
	acctgcaccg tctctgggtt ctactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt	120
30	cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt ttctgagtga cgaaaaatcc	180
	tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg	240
	gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata	300
35	cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtctc ctca	354
40	<210> 67 <211> 118 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетична	
45	<400> 67	
50	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu 1 5 10 15	
	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly 20 25 30	
55	Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu 35 40 45	
60	Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser 50 55 60	

5 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 10 Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 15 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 20 <210> 68
 <211> 121
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 68
 30 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 35 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 40 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 45 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 50 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 55 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 60 <210> 69

<211> 318
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Синтетична

10 <220>
 <221> ІНША ОЗНАКА
 <222> (246)..(246)
 <223> н являє собою а, с, г, или т

<400> 69
 15 cagccagtgc tgactcagcc cccctcactg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagagaaatt gggggataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgttgggtcat gtatcaagat aaacagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 20 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgangctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
 25 accaagctga ccgtccta 318

<210> 70
 <211> 106
 30 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична

35 <400> 70

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 40 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 45 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 50 Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 55 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 85 90 95
 60

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

5 <210> 71
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Синтетична

<400> 71

15 Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

20 Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val
20 25 30

25 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

30 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly
65 70 75 80

35 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His
85 90 95

40 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly
100 105 110

45 Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
115 120

50
20

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

55 1. Спосіб лікування суб'єкта-людини, який страждає на реакцію трансплантат проти хазяїна (GVHD), що включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу, де інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-
60 H1, CDR-H2 і CDR-H3 з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку

легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 70.

2. Спосіб за п. 1, що додатково включає ідентифікацію суб'єкта-людини, який страждає на реакцію трансплантат проти хазяїна, перед етапом введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для інгібування MASP-2-залежної активації комплементу.

3. Спосіб за п. 1, за яким суб'єкт отримувач раніше трансплантат гемопоетичних стовбурових клітин.

4. Спосіб за п. 1, за яким суб'єкт страждає на гостру GVHD.

5. Спосіб за п. 1, за яким суб'єкт страждає на хронічну GVHD.

6. Спосіб за п. 1, за яким суб'єкт страждає на резистентну до стероїдів GVHD.

7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, що включає введення суб'єкту композиції, яка містить вказане інгібуюче MASP-2 антитіло, в дозі від 1 до 10 мг/кг щонайменше один раз на тиждень.

8. Спосіб за п. 1, де суб'єкт страждає на один або більше неврологічних симптомів, пов'язаних з реакцією трансплантат проти хазяїна, і спосіб включає введення суб'єкту до, в процесі або після отримання трансплантата гемопоетичних стовбурових клітин композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, в кількості, ефективній для лікування, запобігання або полегшення одного або більше неврологічних симптомів, пов'язаних з реакцією трансплантат проти хазяїна.

9. Спосіб за п. 8, за яким один або більше неврологічних симптомів, пов'язаних з реакцією трансплантат проти хазяїна або HSCT-TMA, вибирають з групи, яка складається з астенії, парестезії, тетраплеїї, сенсорно-рухових порушень, вегето-судинної поліневропатії і/або нейрогенного сечового міхура.

10. Спосіб за п. 1, за яким інгібуюче MASP-2 антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 70.

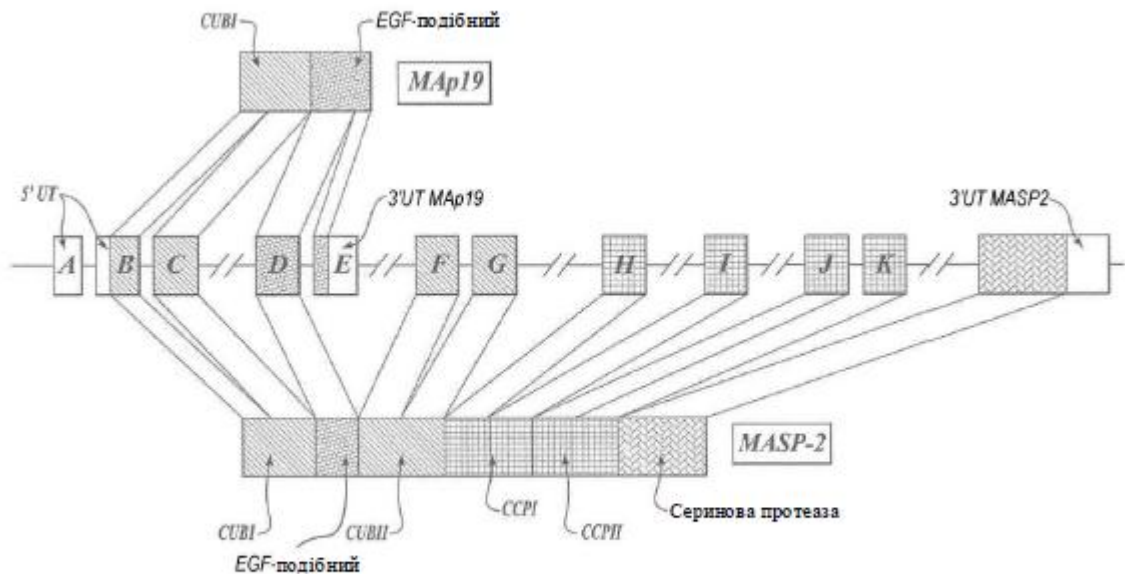
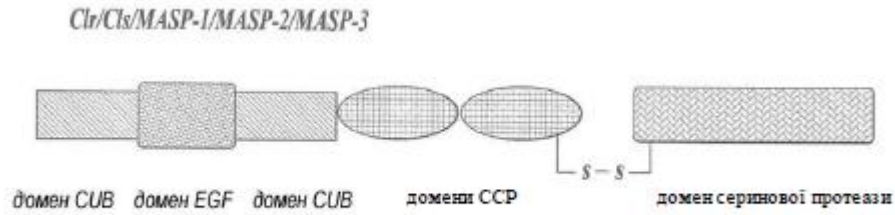
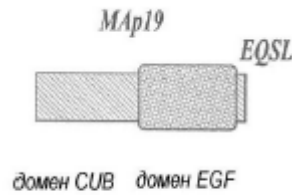


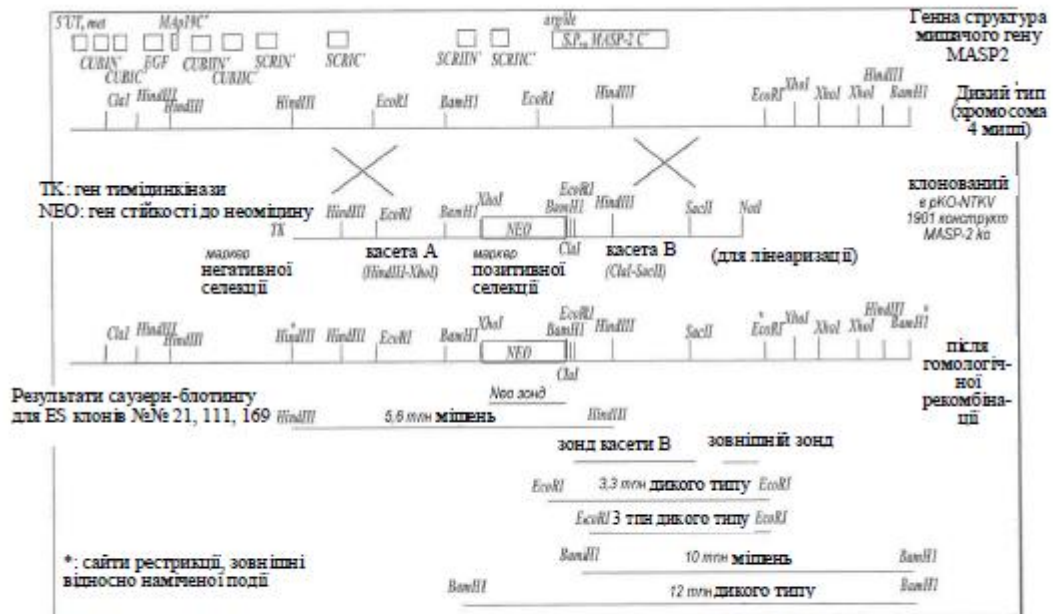
Fig. 1



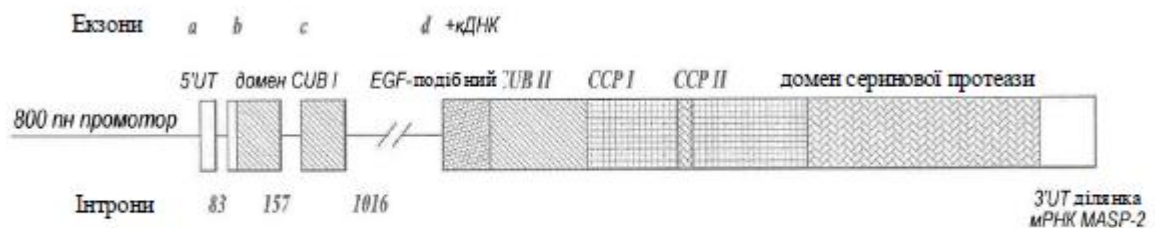
Фіг. 2А



Фіг. 2В



Фіг. 3



Фіг. 4

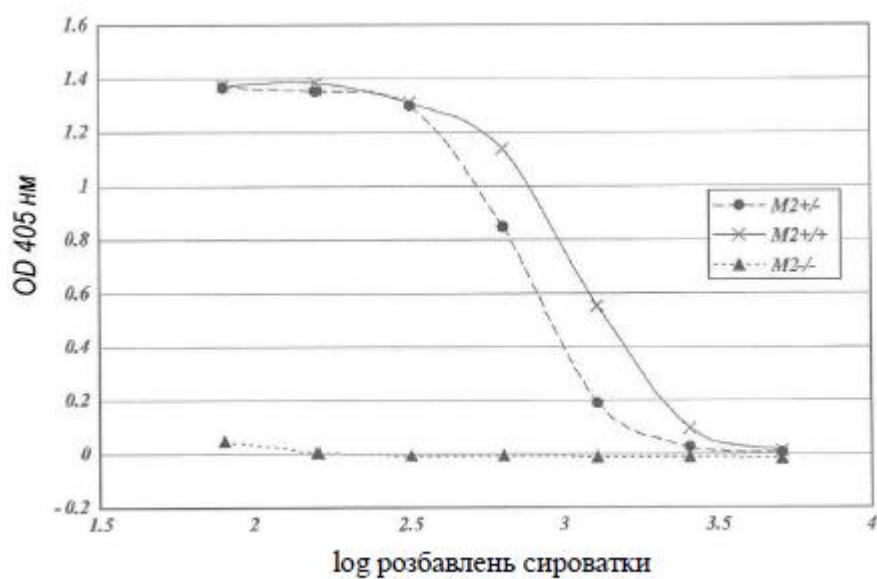


Fig. 5A

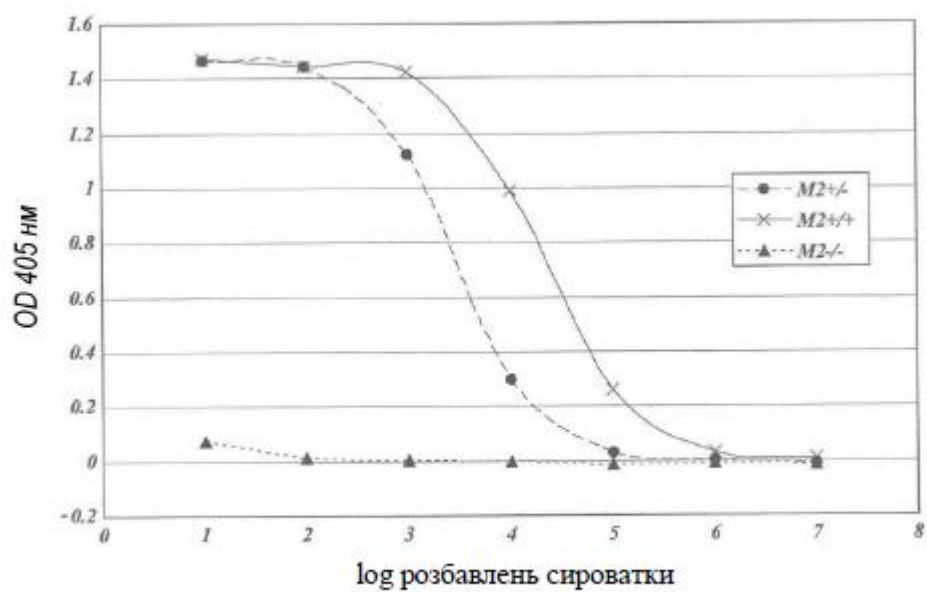


Fig. 5B

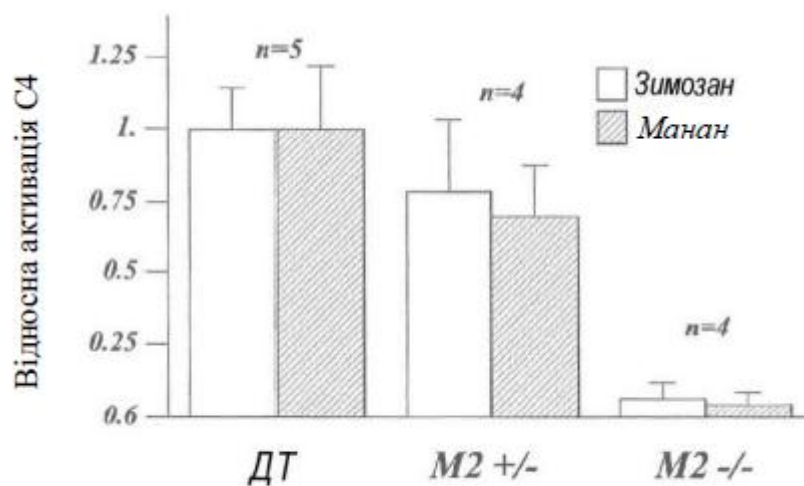


Fig. 5C

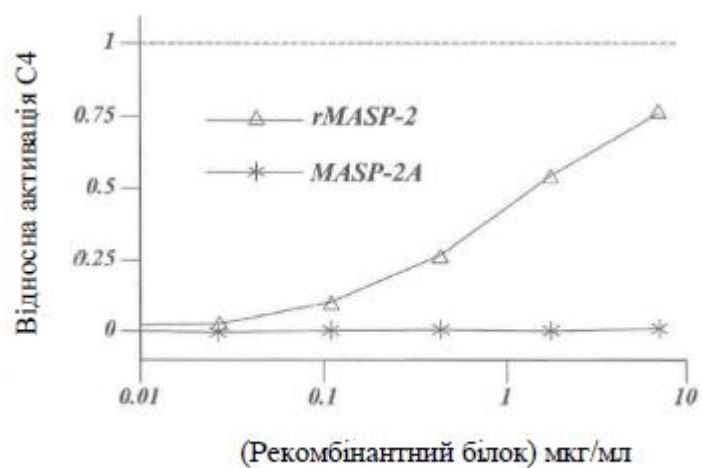


Fig. 6

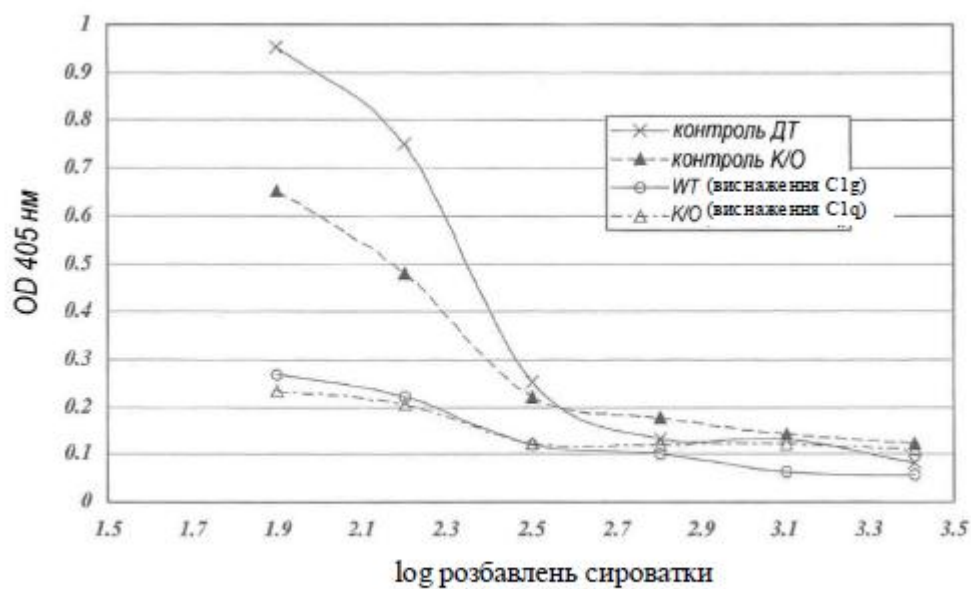


Fig. 7

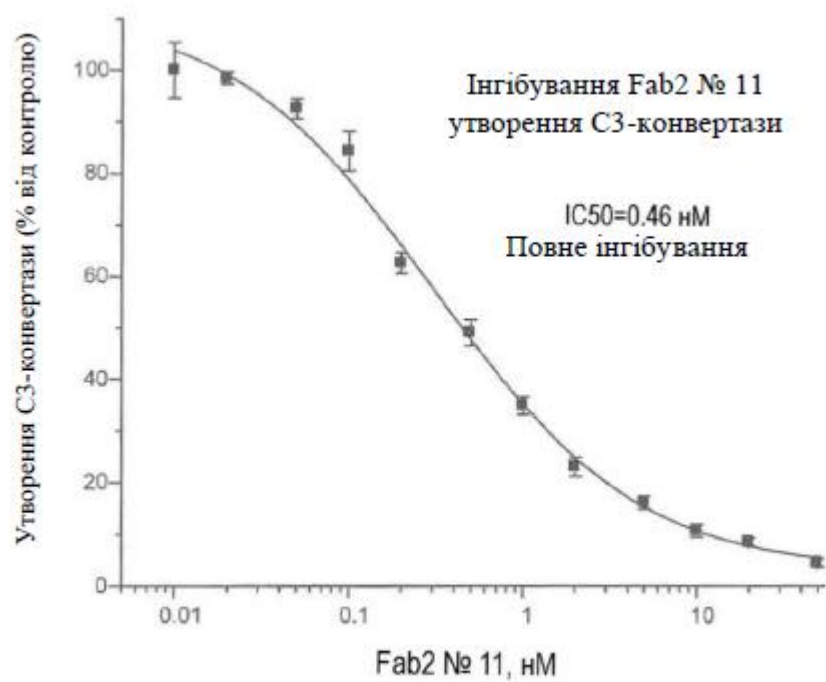


Fig. 8A

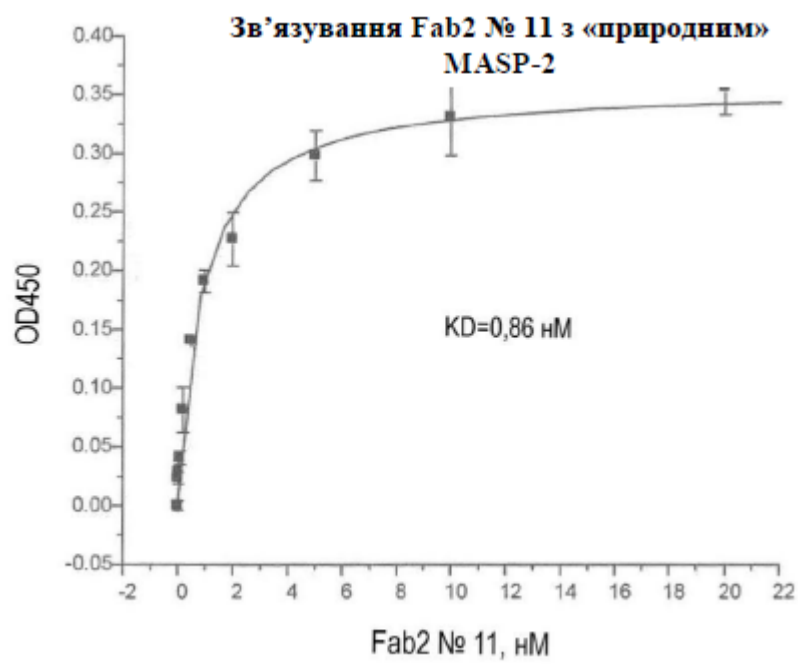


Fig. 8B

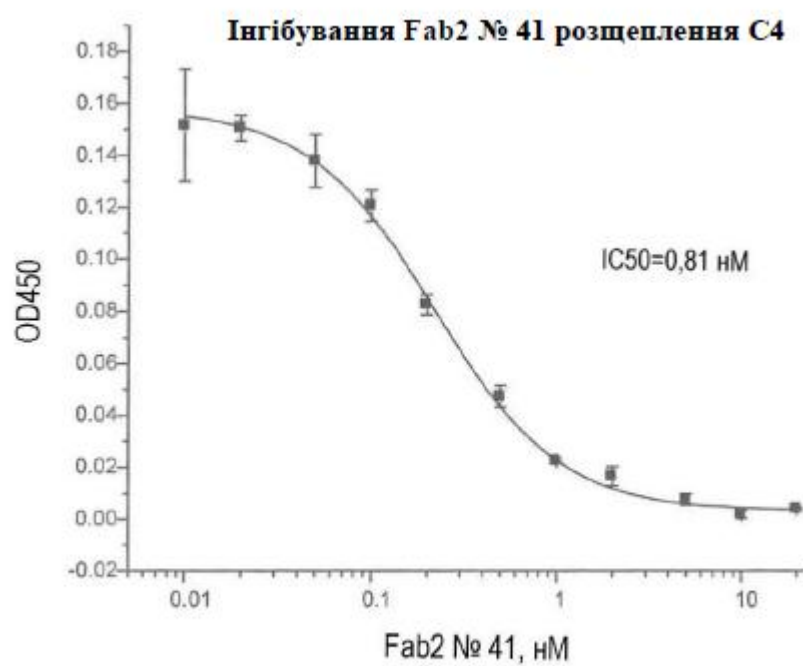


Fig. 8C

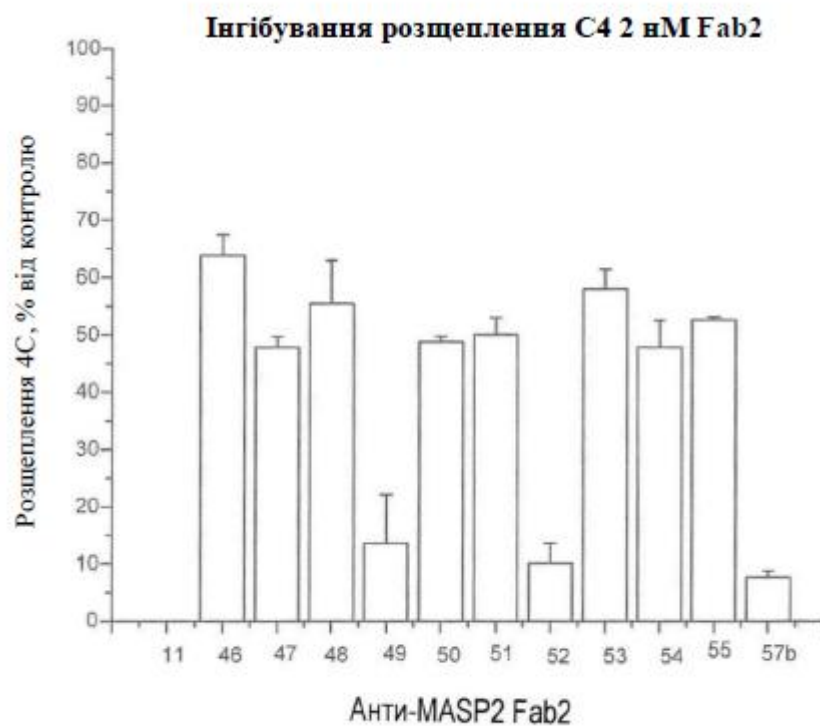


Fig. 9

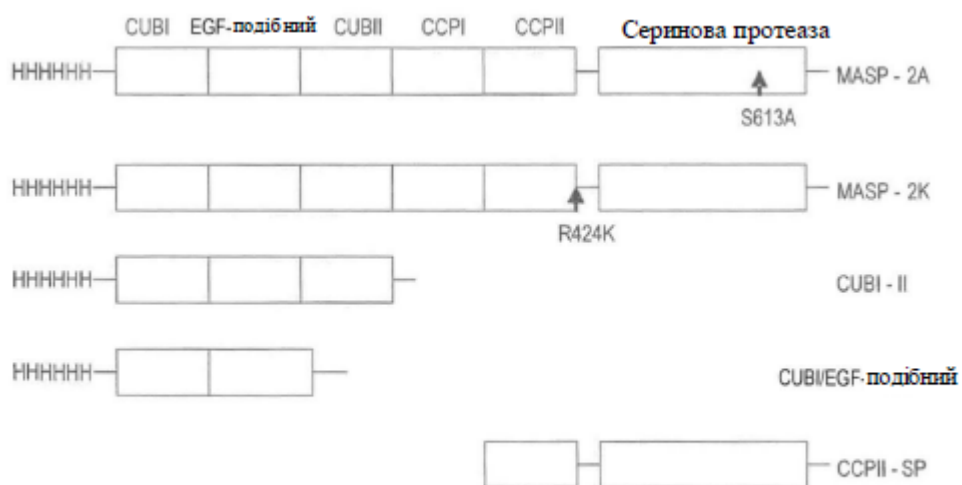


Fig. 10

Зв'язування AbD Ат № 40 і № 60 з поліпептидами щурячого MASP2

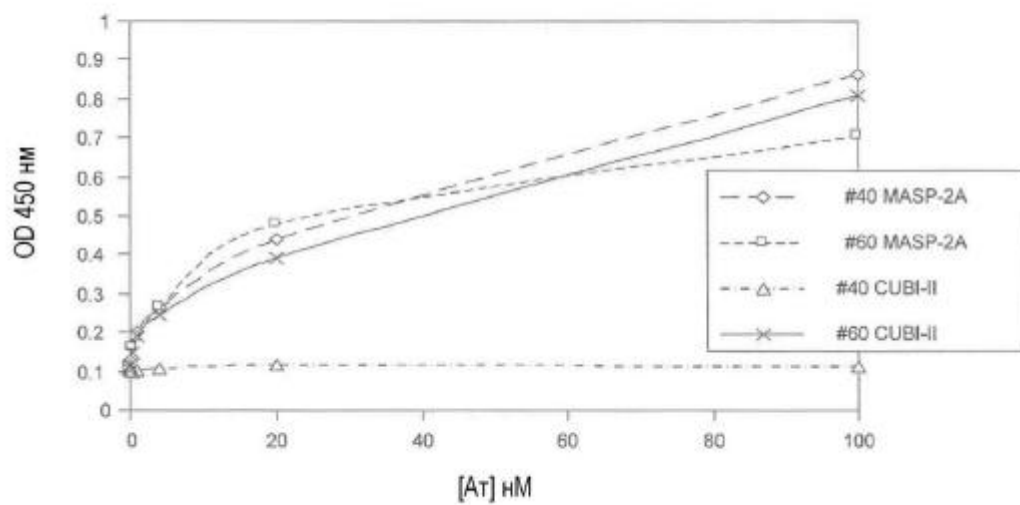


Fig. 11

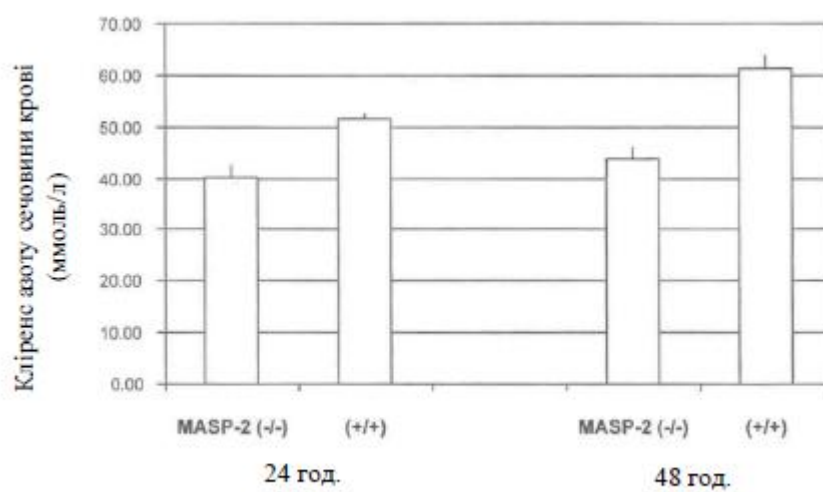


Fig. 12

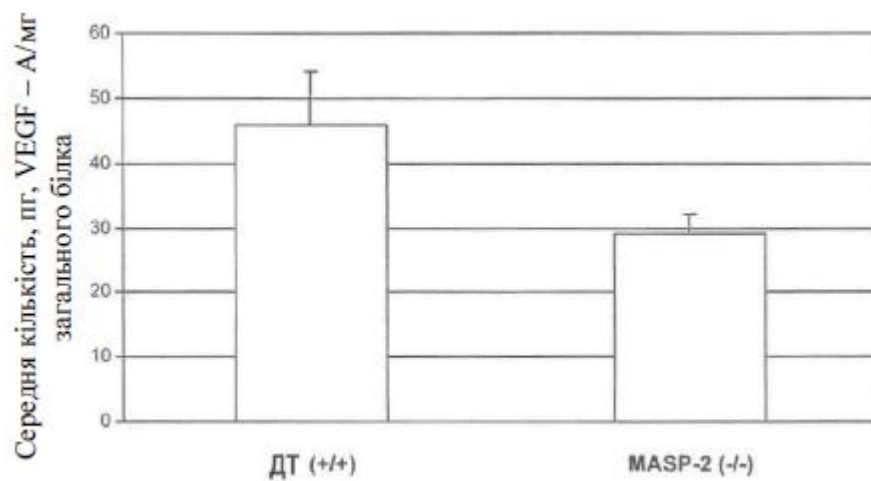


Fig. 13A

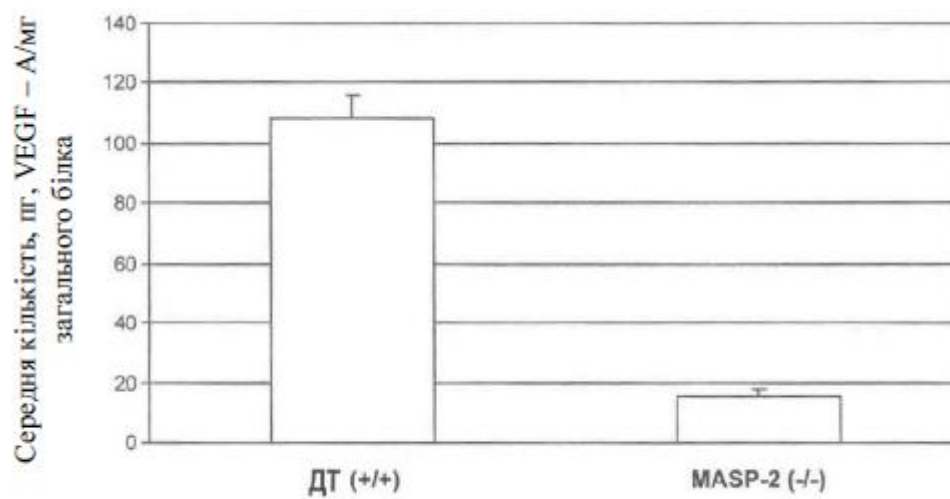
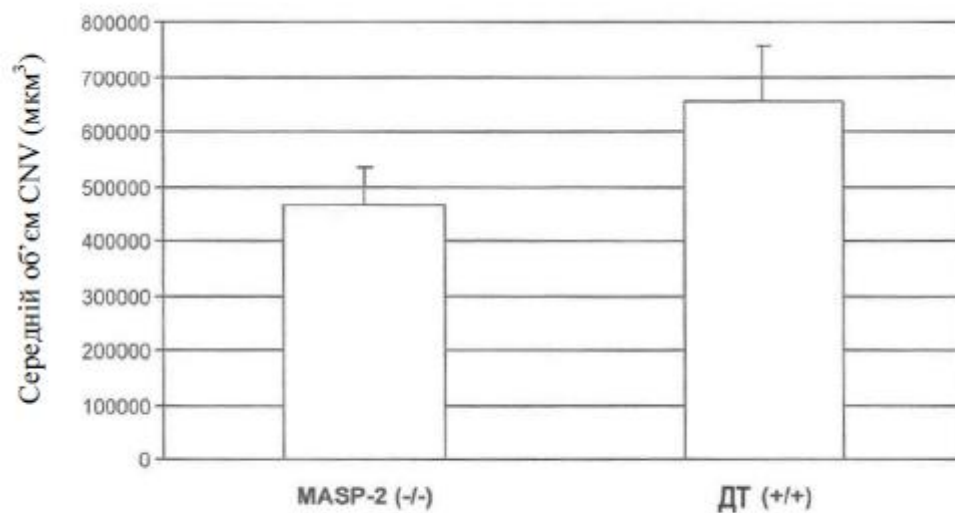
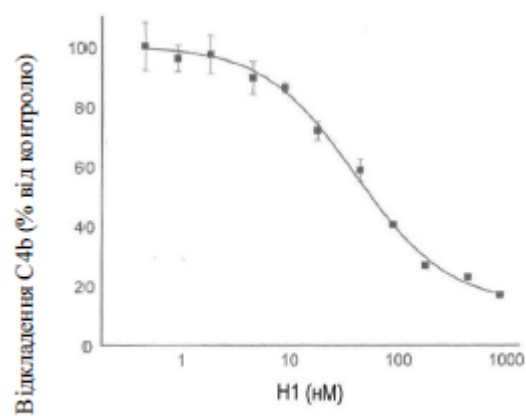


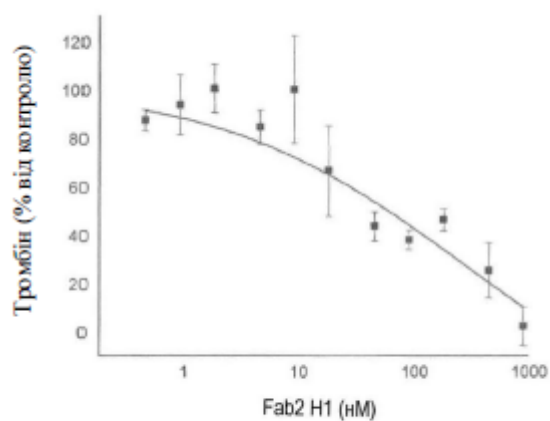
Fig. 13B



Фіг. 14



Фіг. 15A



Фіг. 15B

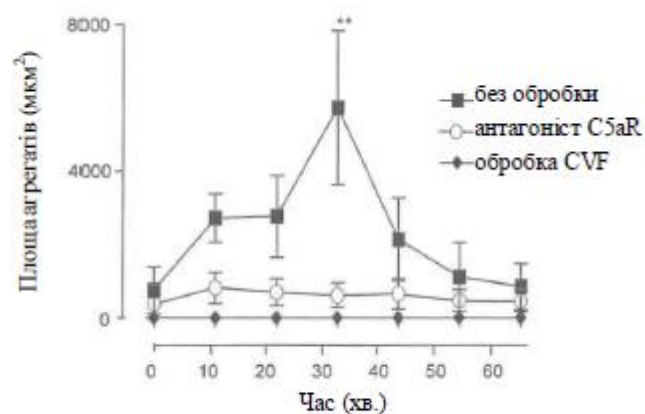


Fig. 16A

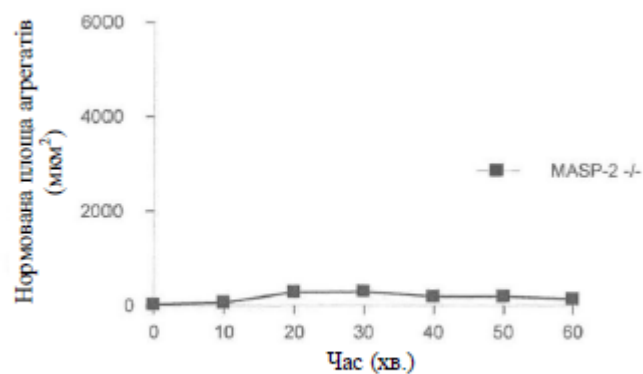


Fig. 16B

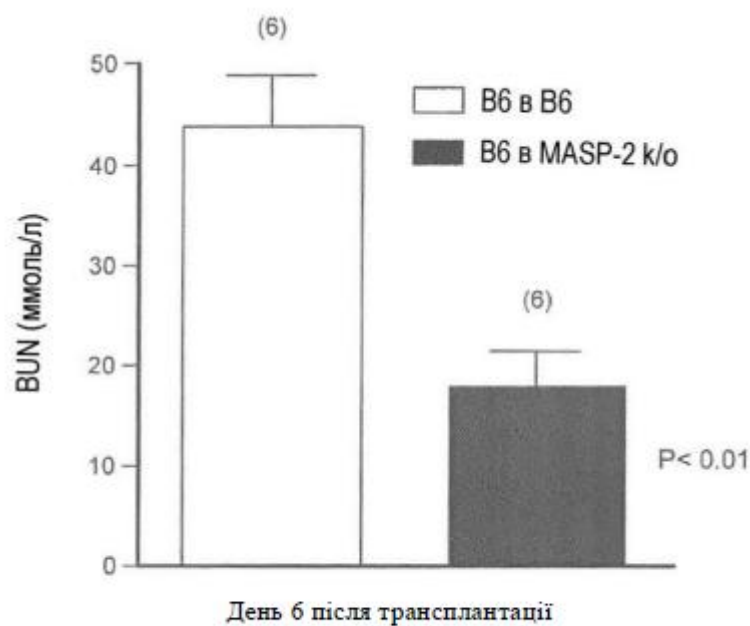


Fig. 17

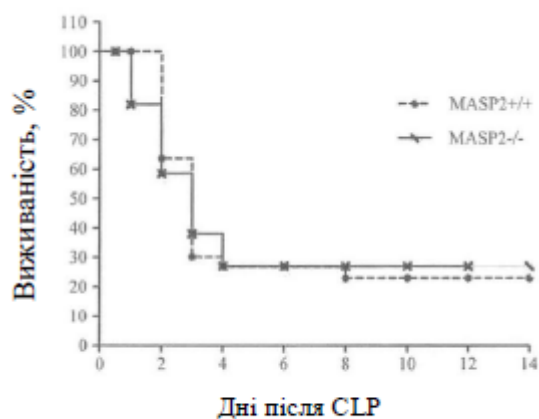


Fig. 18

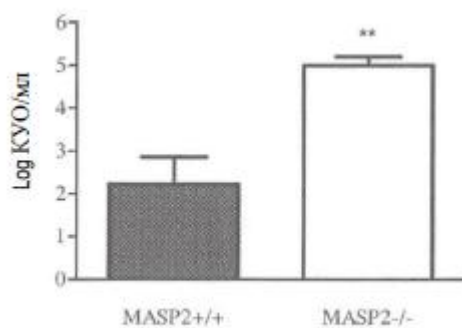


Fig. 19

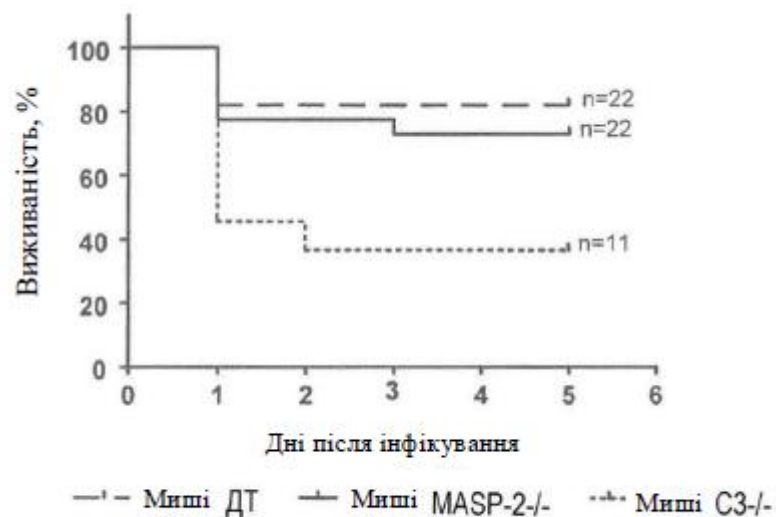


Fig. 20

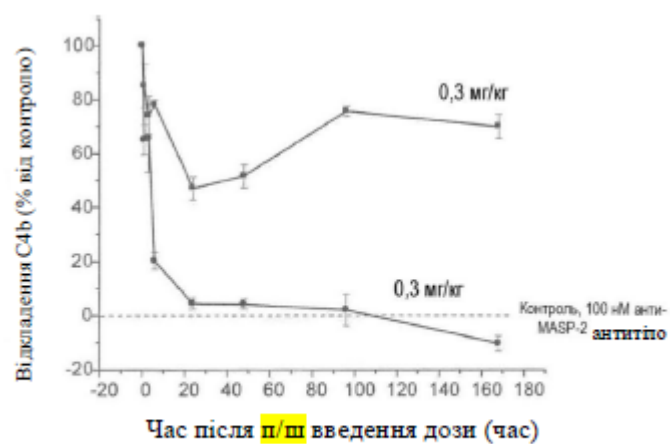


Fig. 21

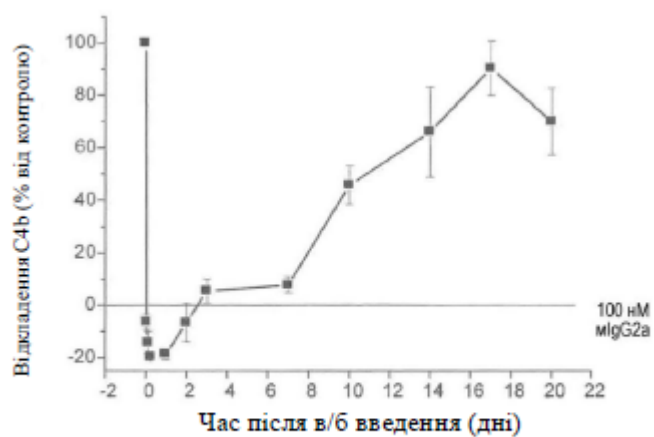


Fig. 22

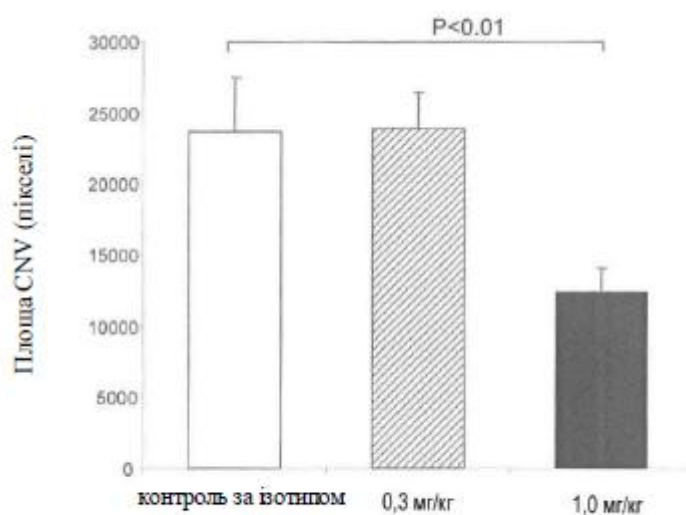
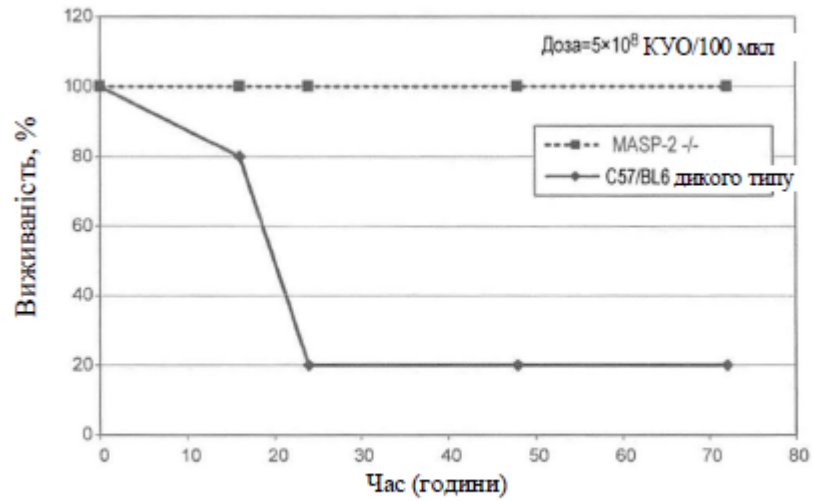
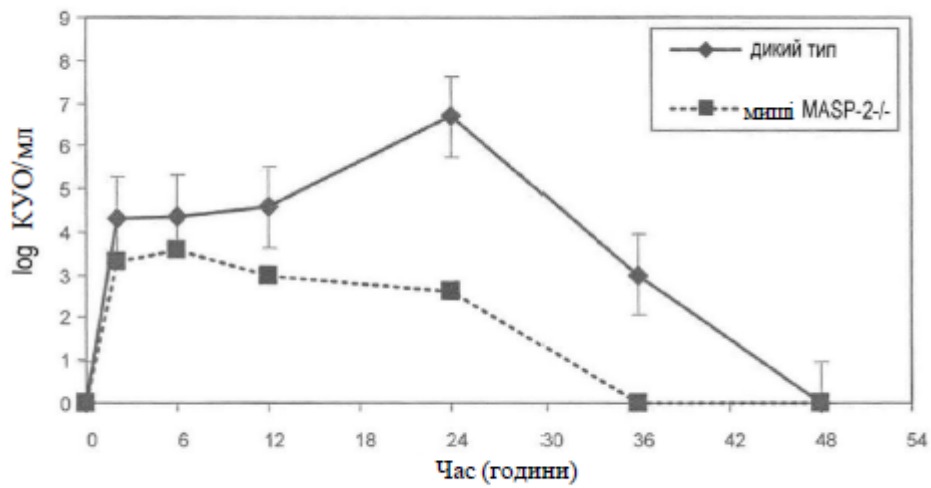


Fig. 23

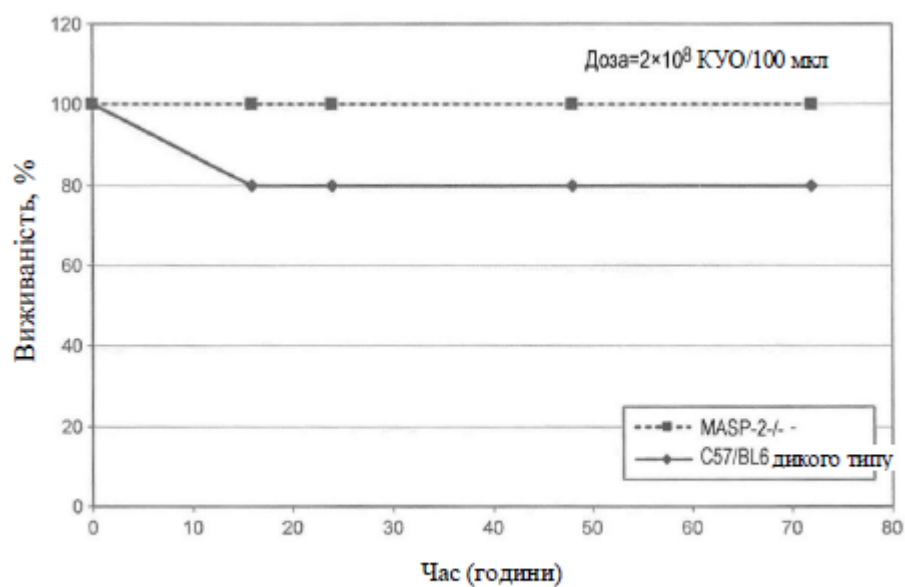


Фіг. 24А

Кількість КУО *N.meningitidis*, вилучених у різні моменти часу з крові мишей дикого типу і МАСР-2^{-/-} після інфікування 5×10^8 КУО/100 мкл КУО *N.meningitidis*

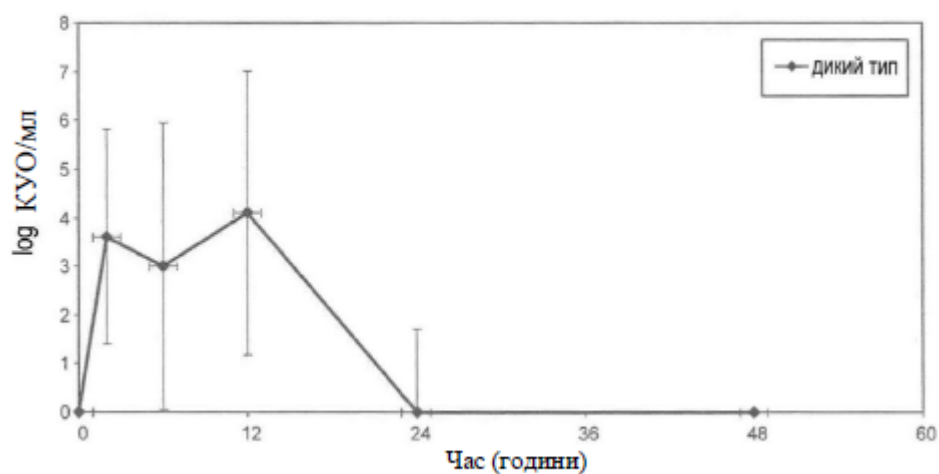


Фіг. 24В



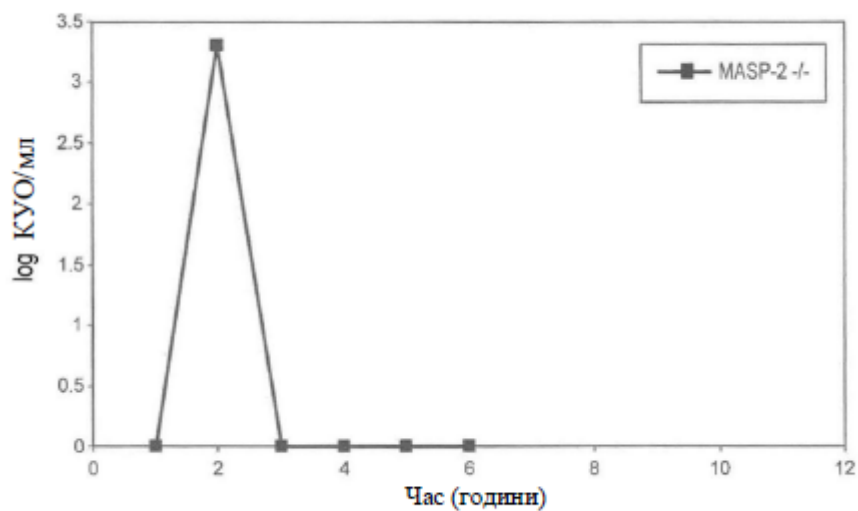
Фіг. 25А

Кількість КУО *N.meningitidis*, вилучених у різні моменти часу з крові мишей C57/BL6 дикого типу після інфікування 2×10^8 КУО/100 мкл КУО *N.meningitidis*

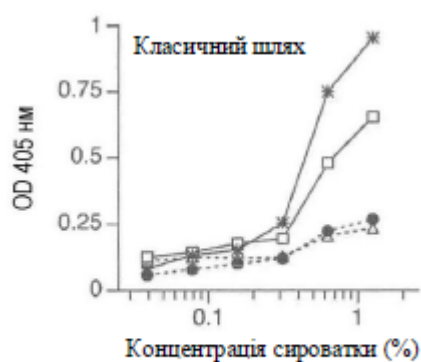


Фіг. 25В

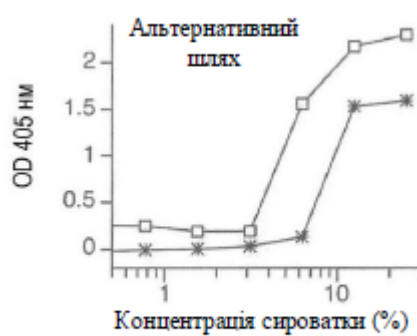
Кількість КУО *N.meningitidis*, вилучених у різні моменти часу з крові мишей з нокаутом MASP-2 після інфікування 2×10^8 КУО/100 мкл КУО *N.meningitidis*



Фіг. 25С



Фіг. 25А



Фіг. 25В

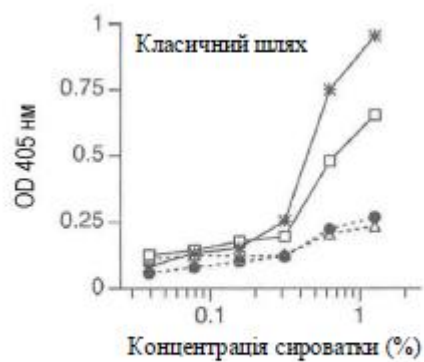


Fig. 26A

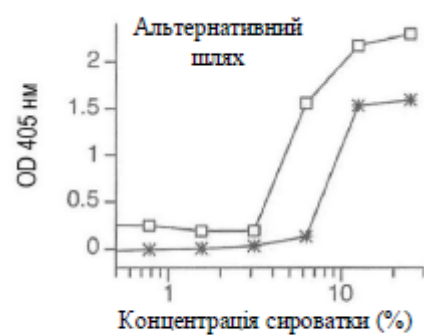


Fig. 26B

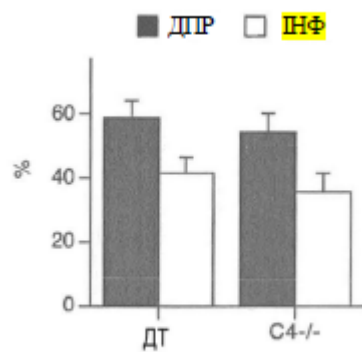


Fig. 27A

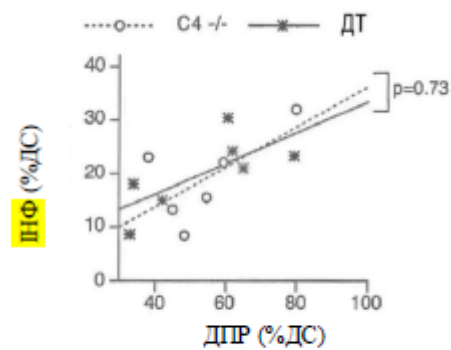


Fig. 27B

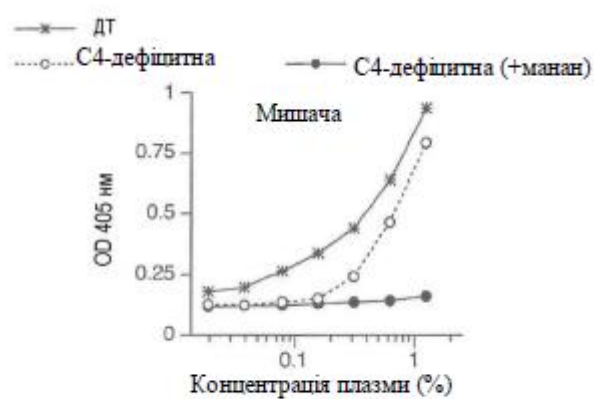


Fig. 28A

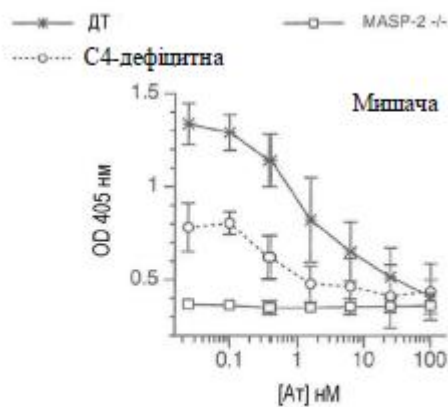


Fig. 28B

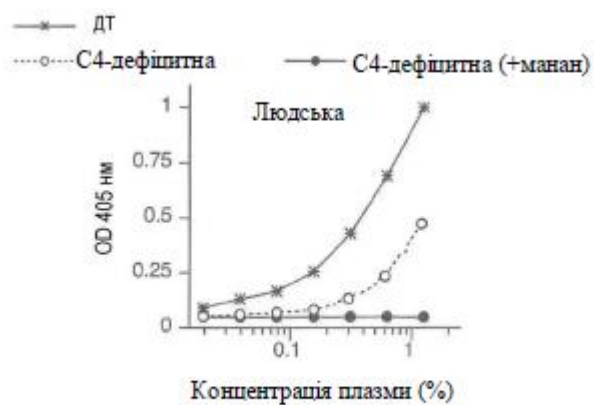


Fig. 28C

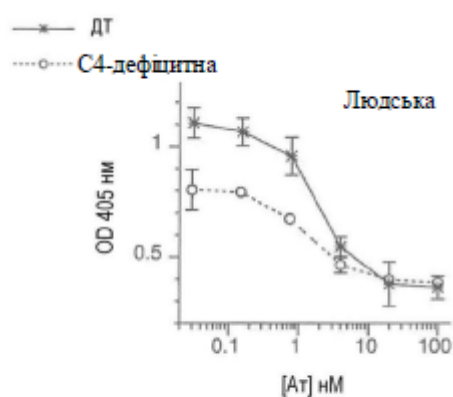


Fig. 28D

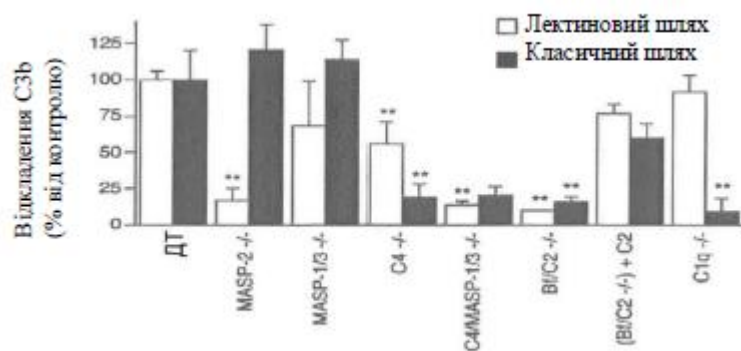


Fig. 29A

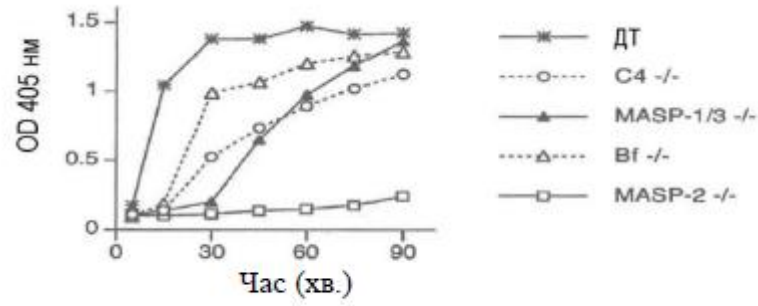


Fig. 29B

Активация C3 тромбиновыми субстратами

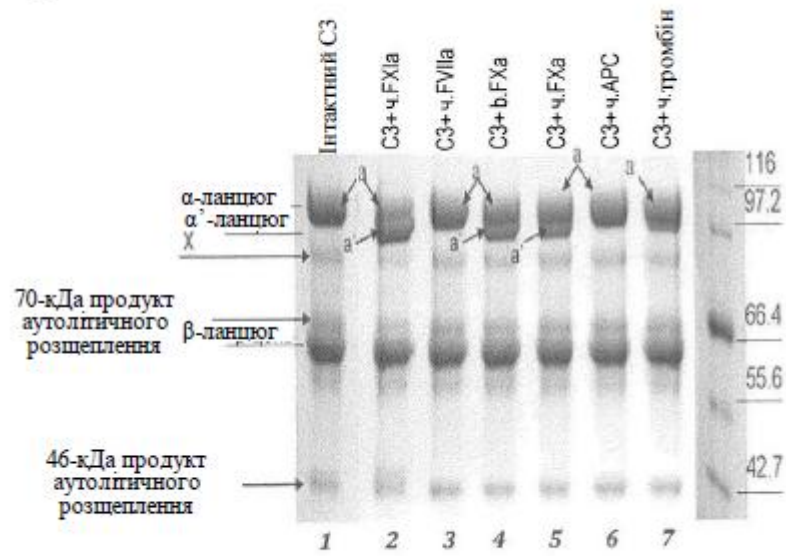


Fig. 30

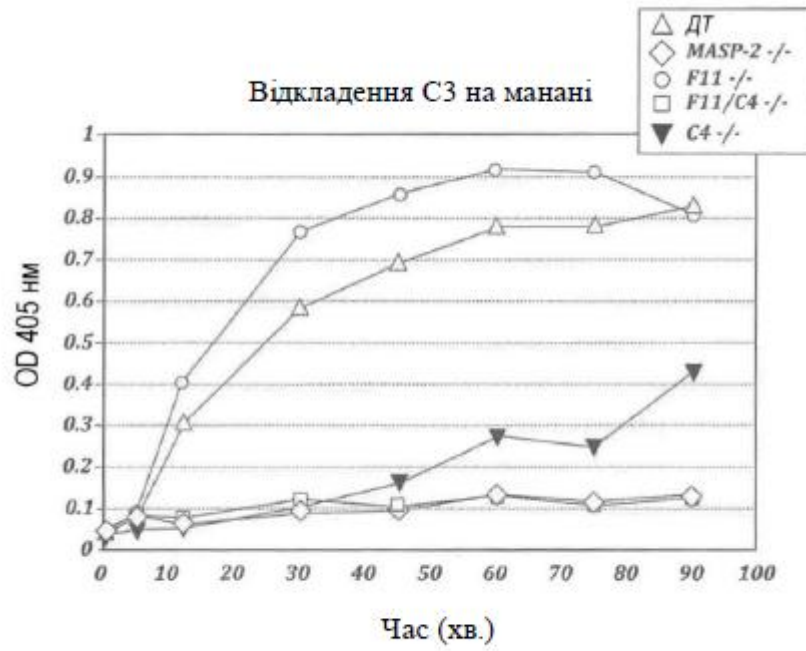


Fig. 31

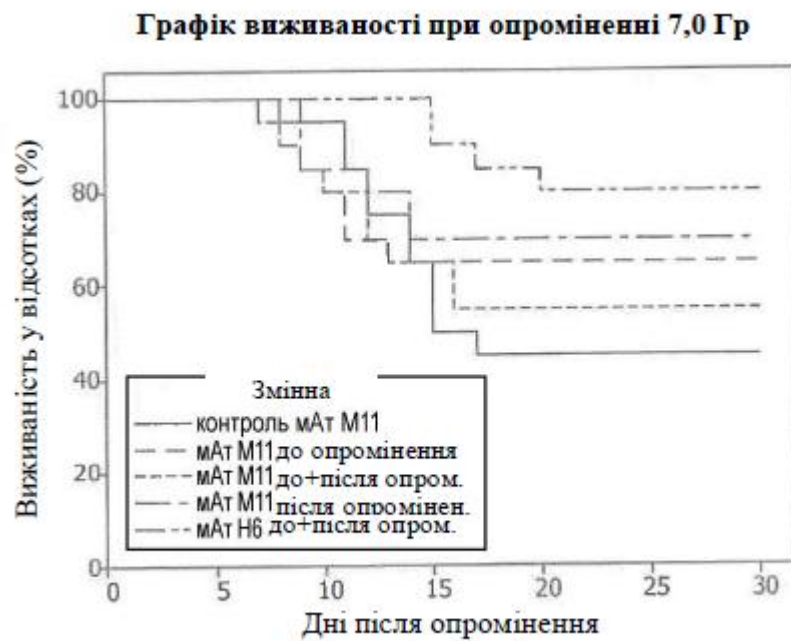
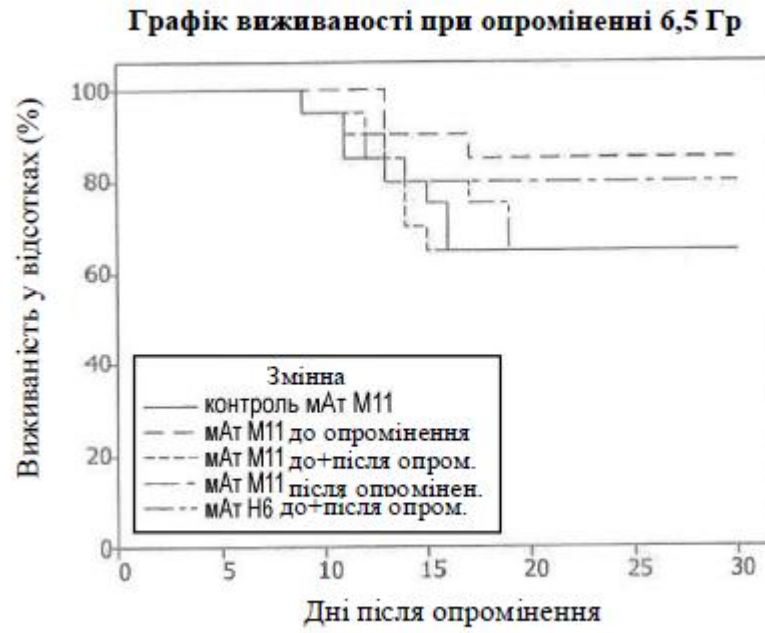
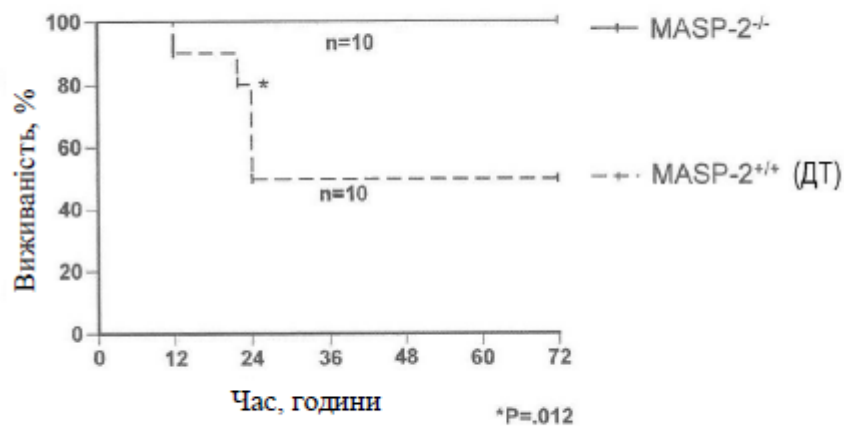


Fig. 32A



Фіг. 32В

Вживаність після інфікування *N/meningitidis* серогрупи А Z2491



Фіг. 33

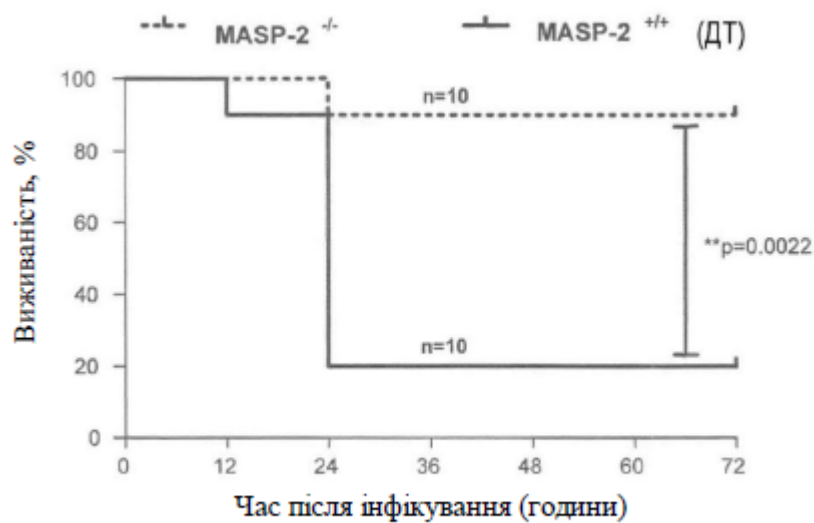


Fig. 34

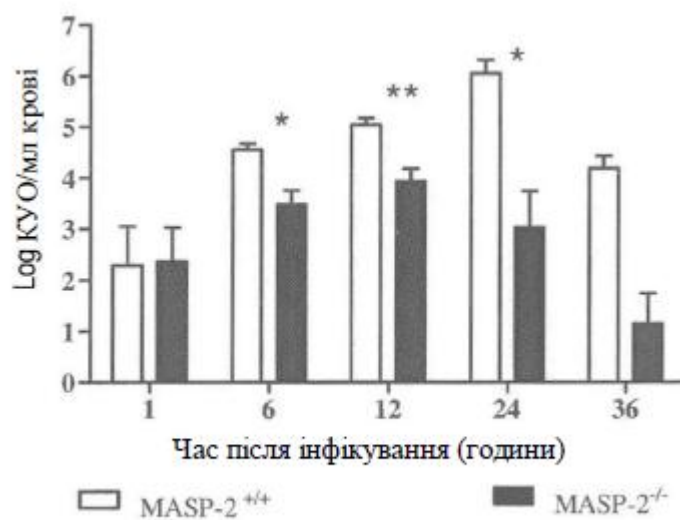


Fig. 35

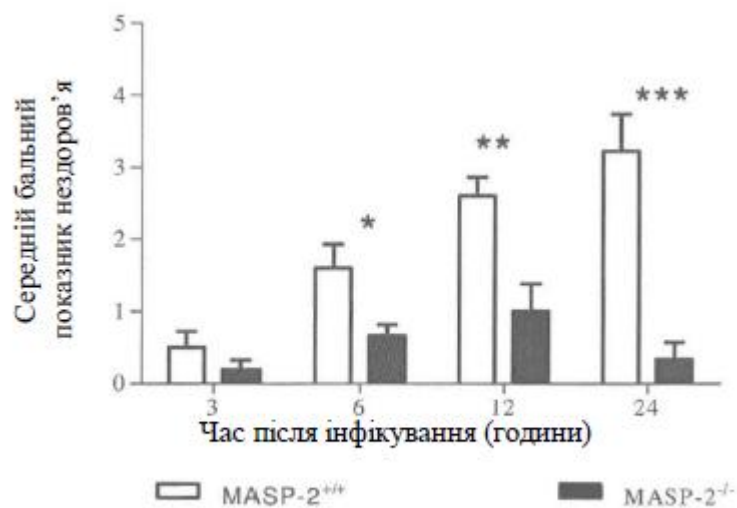


Fig. 36

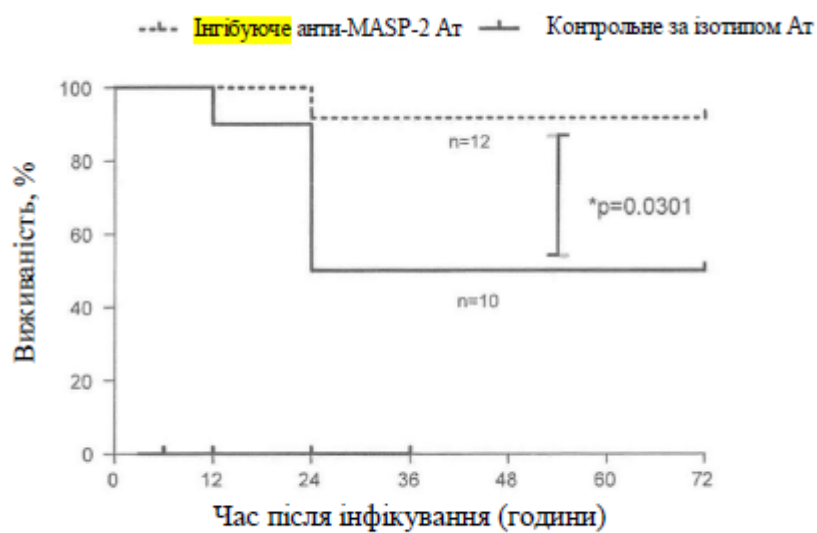


Fig. 37

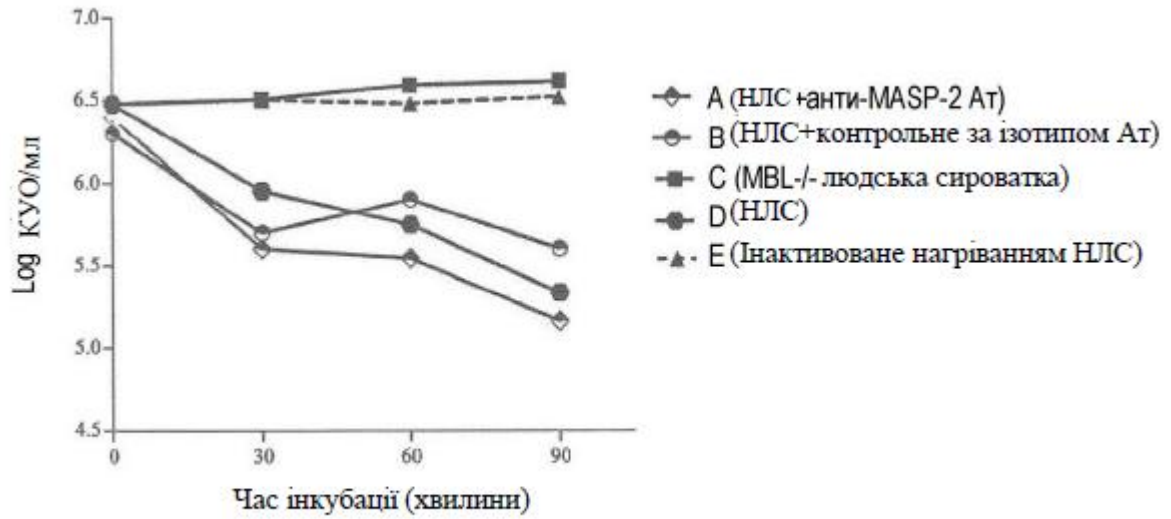


Fig. 38

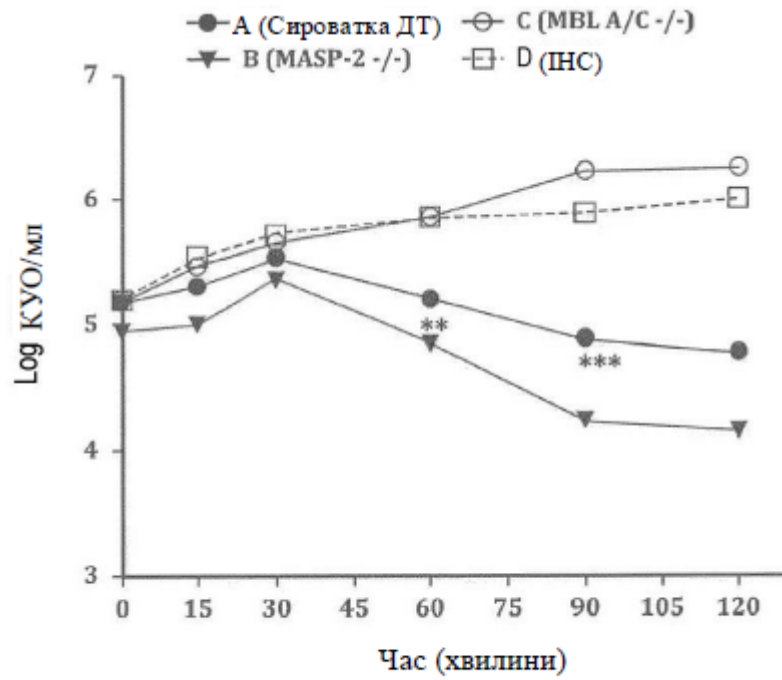


Fig. 39

**Гемоліз покритих мананом мишачих еритроцитів
людською сироваткою**

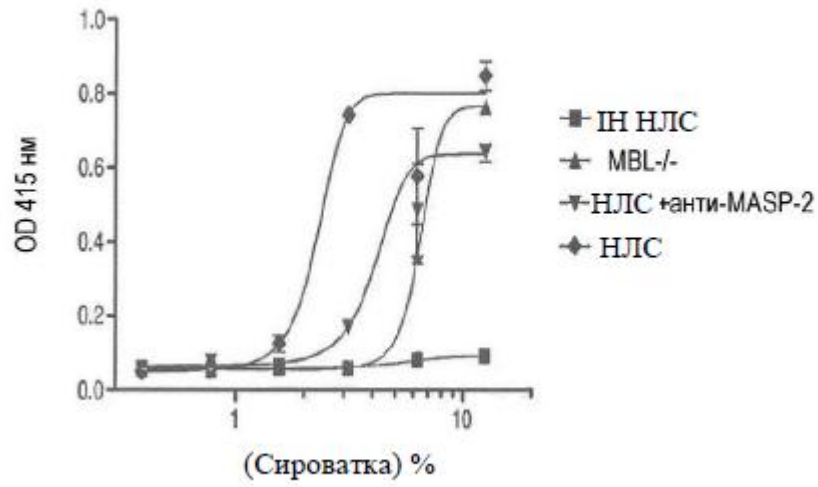


Fig. 40

Гемоліз еритроцитів мишей ДТ людською сироваткою

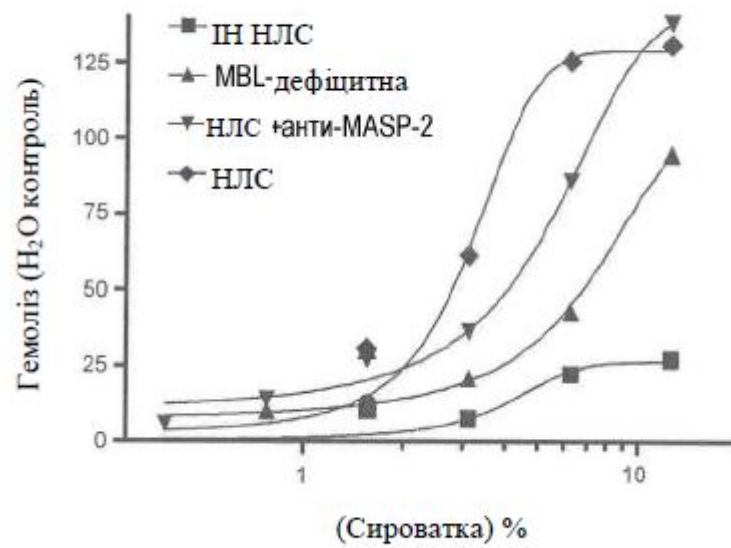


Fig. 41

Гемоліз еритроцитів мишей CD55/59-/- людською сироваткою

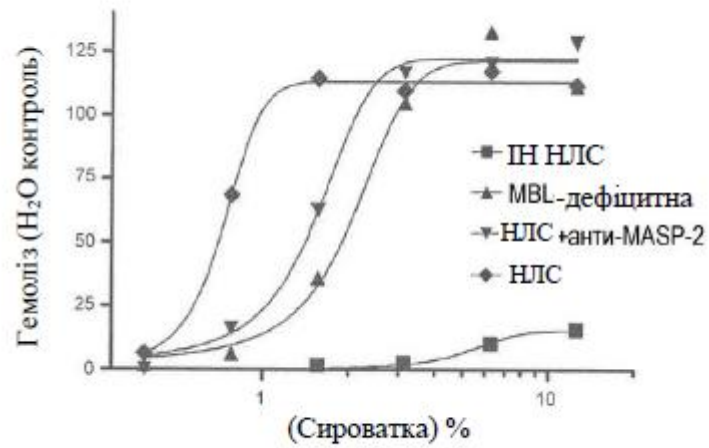


Fig. 42

Вживаність у групах при опроміненні 8,0 Гр

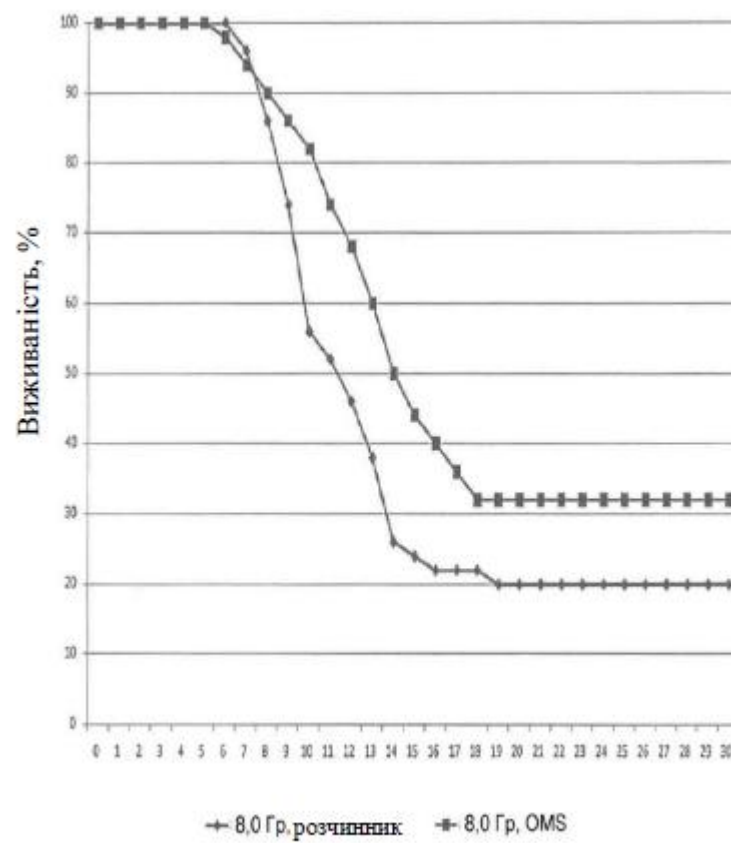


Fig. 43

Час до початку мікрovasкулярної оклюзії після ін'єкції LPS (модель Шварцмана)

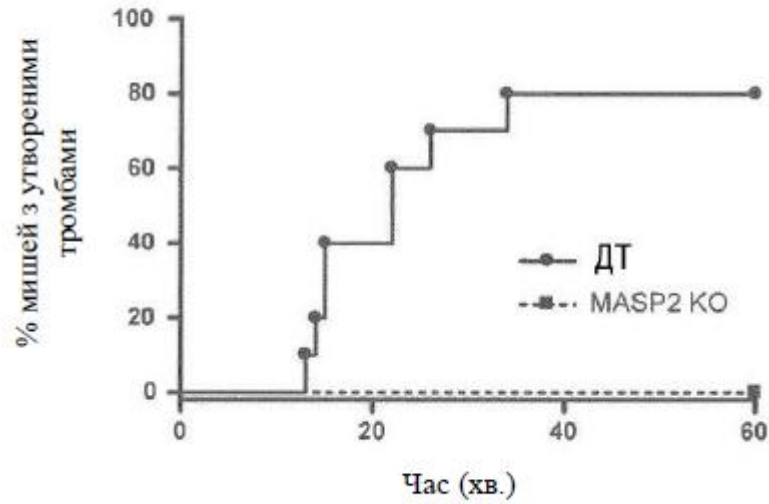


Fig. 44

Вживаність при HUS, індукованому STX/LPS

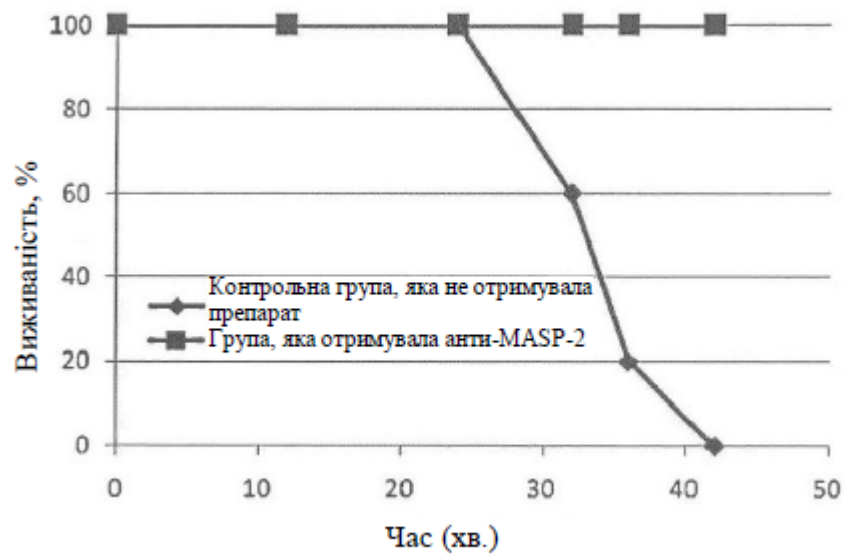
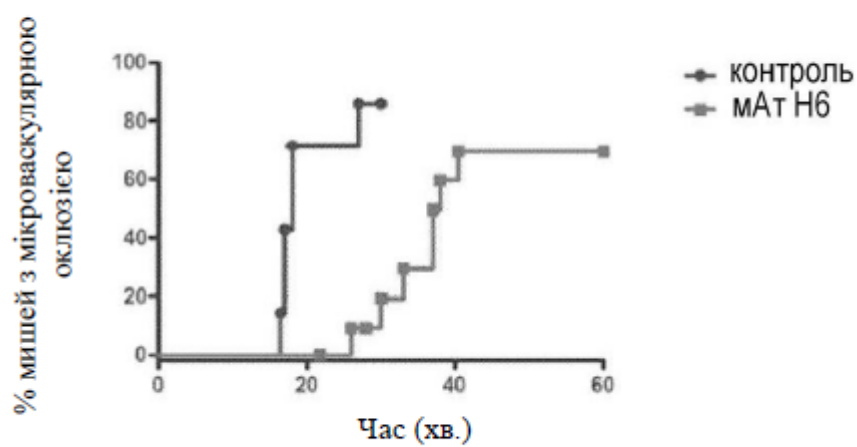


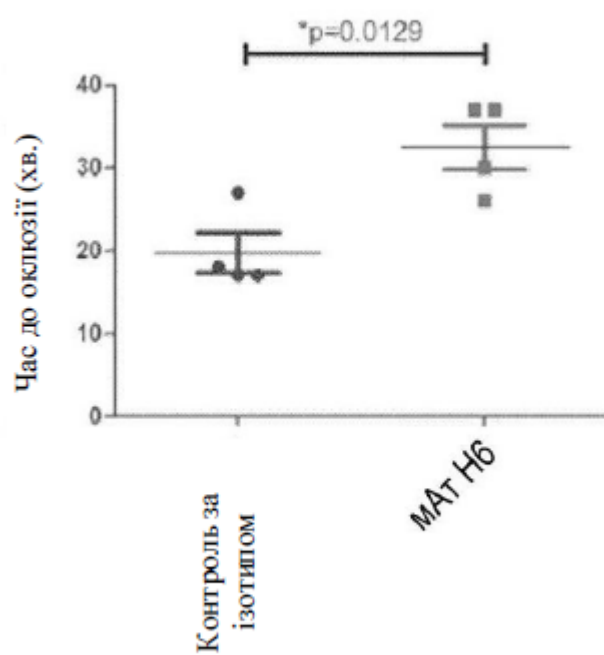
Fig. 45

**мАт Н6 інгібує утворення тромбів у мишачій моделі
індукованої FITC-декстраном тромботичної
мікроангіопатії**



Фиг. 46

Дія FITC



Фиг. 47

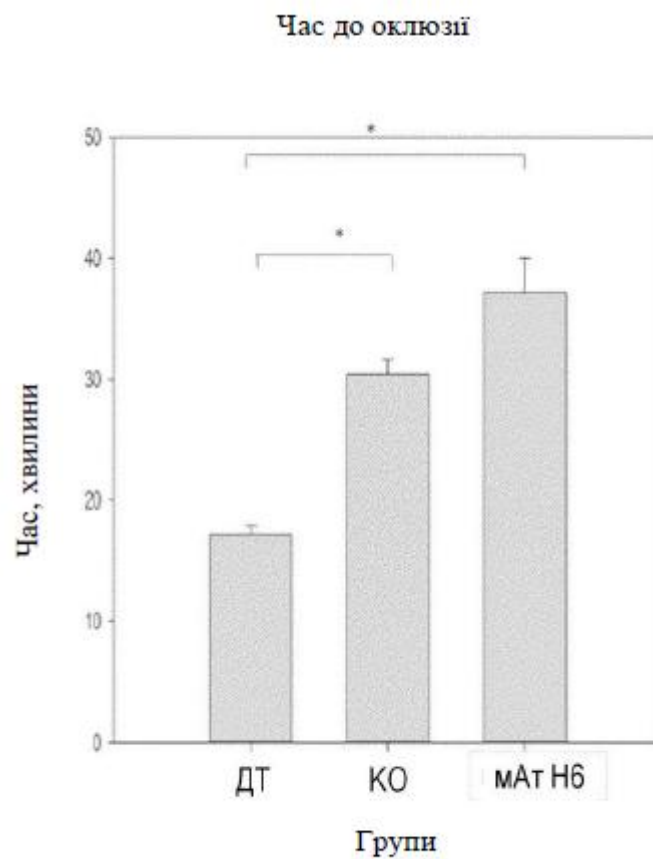


Fig. 48

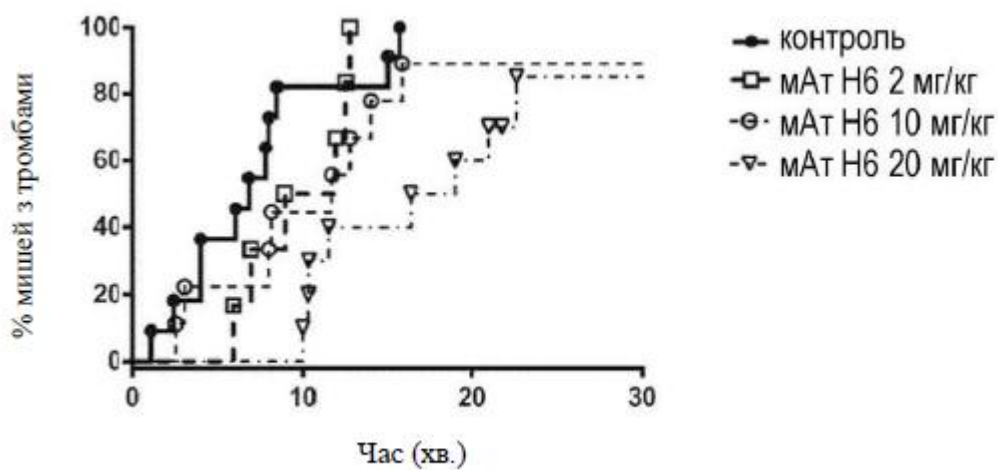


Fig. 49

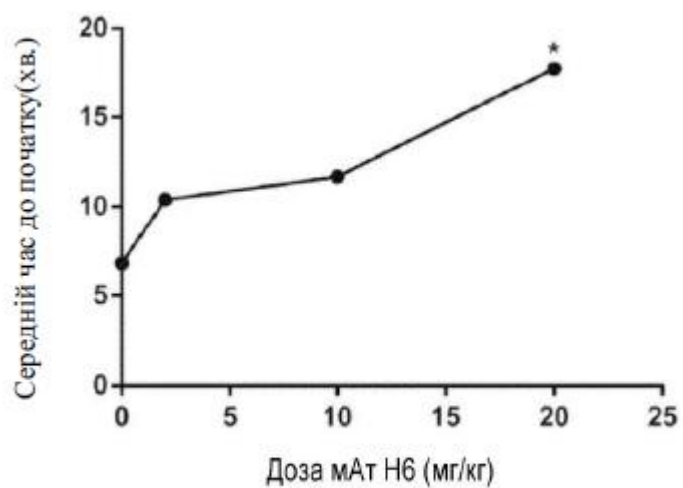


Fig. 50

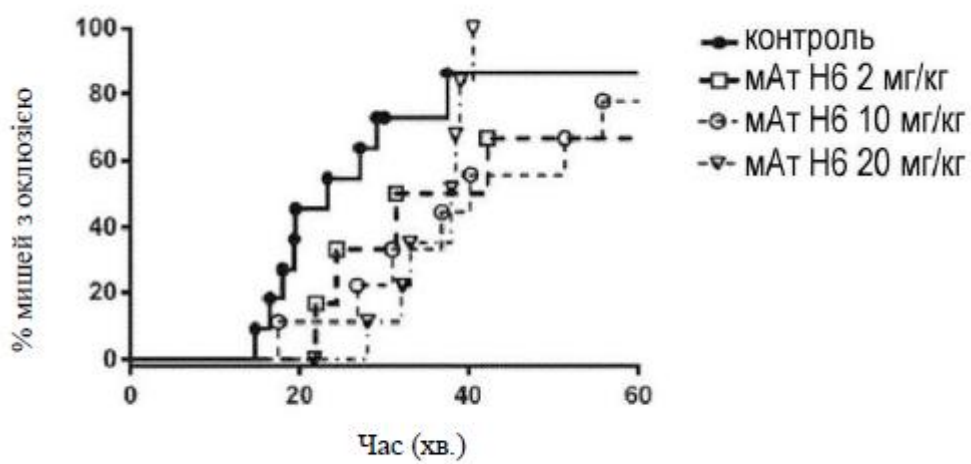


Fig. 51

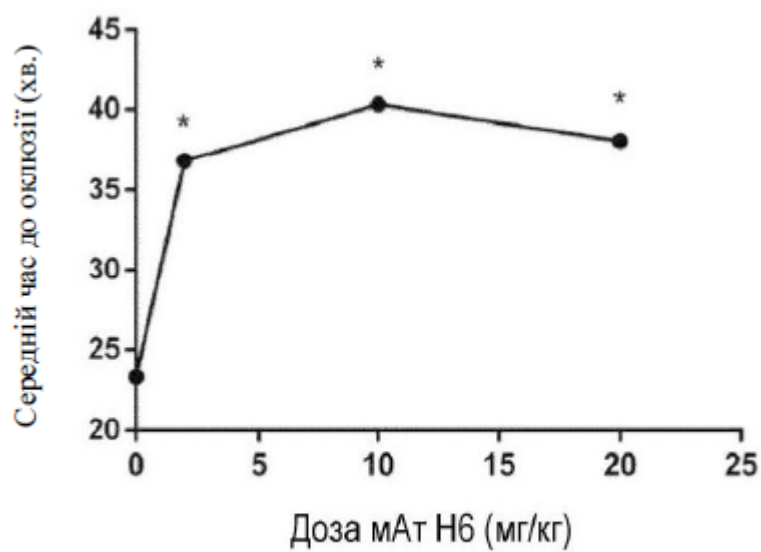


Fig. 52

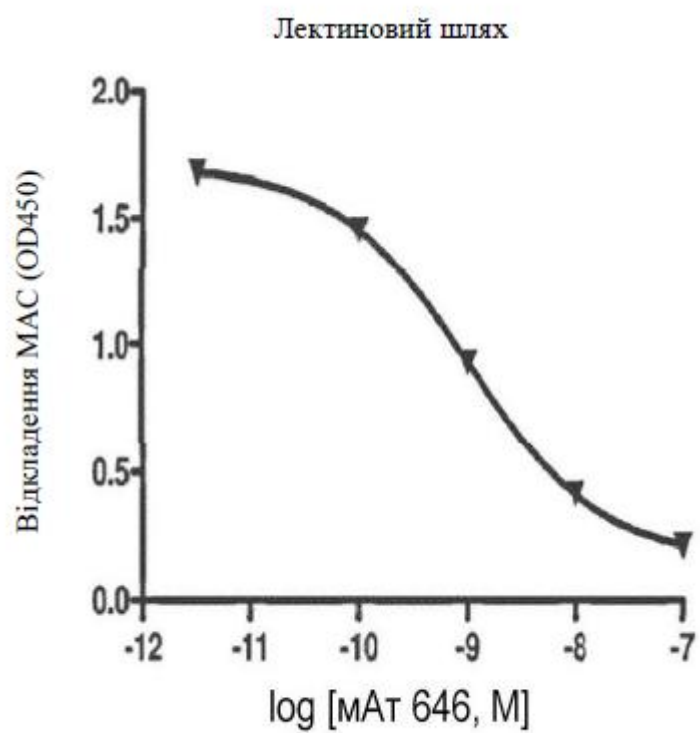


Fig. 53A

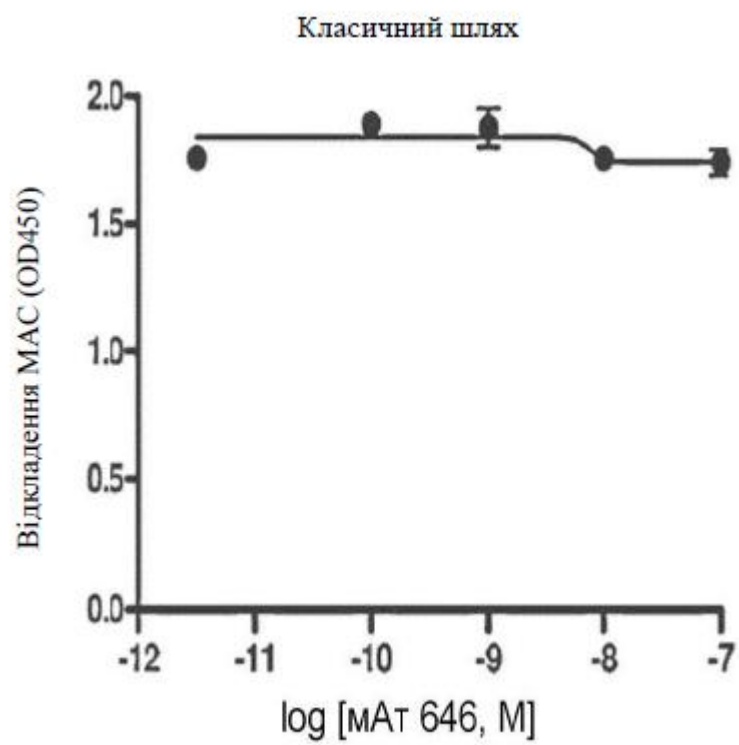


Fig. 53B

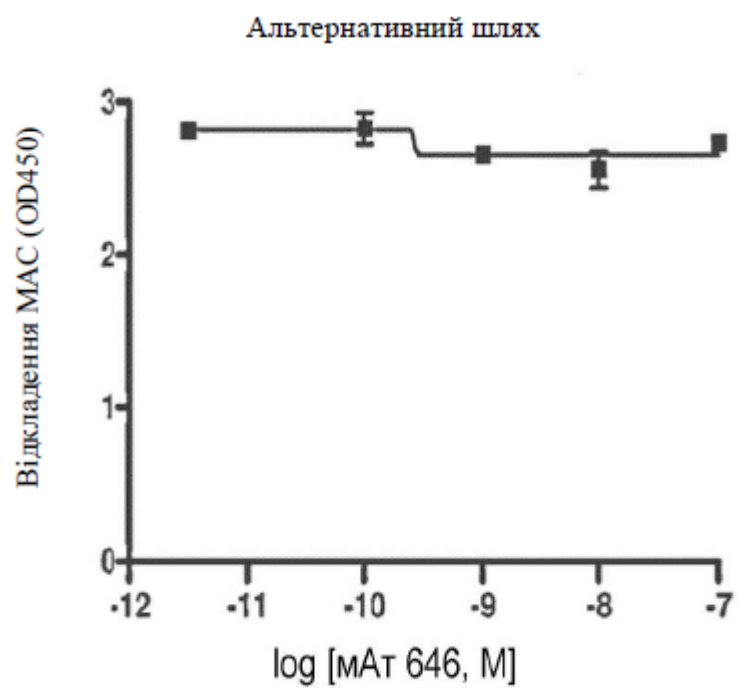


Fig. 53C

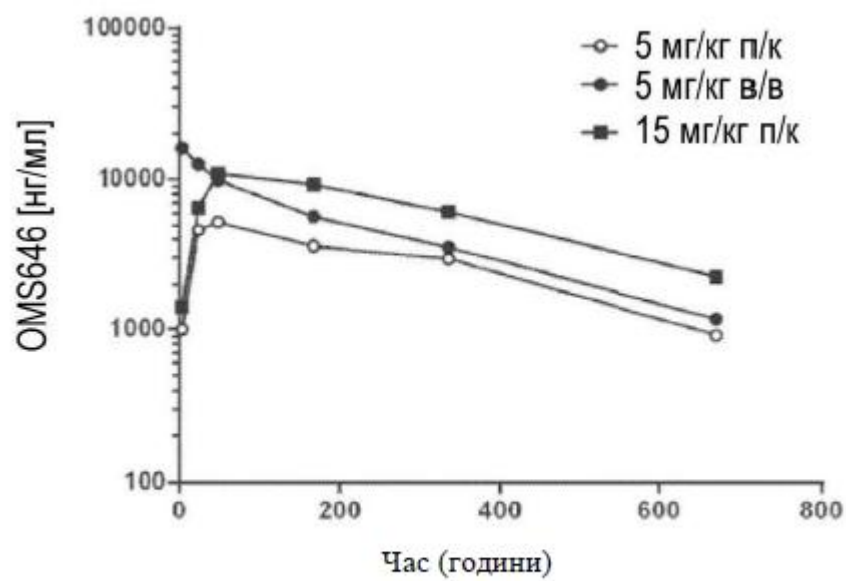


Fig. 54

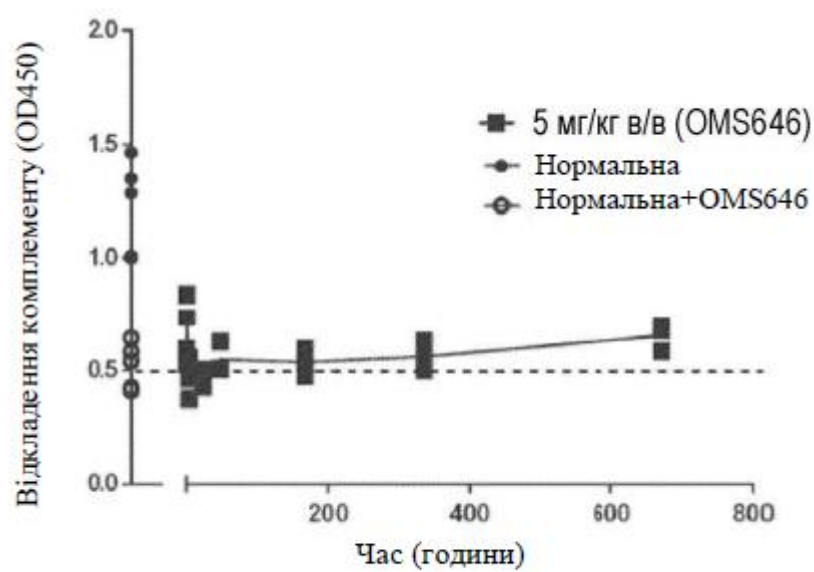
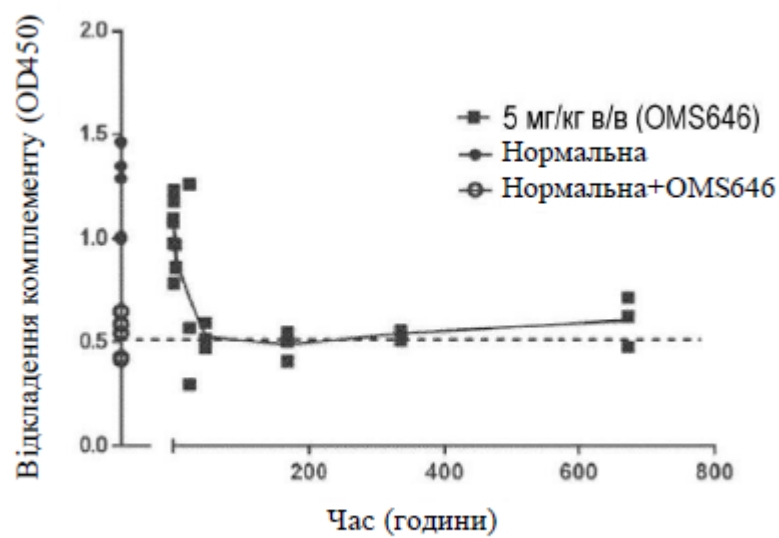
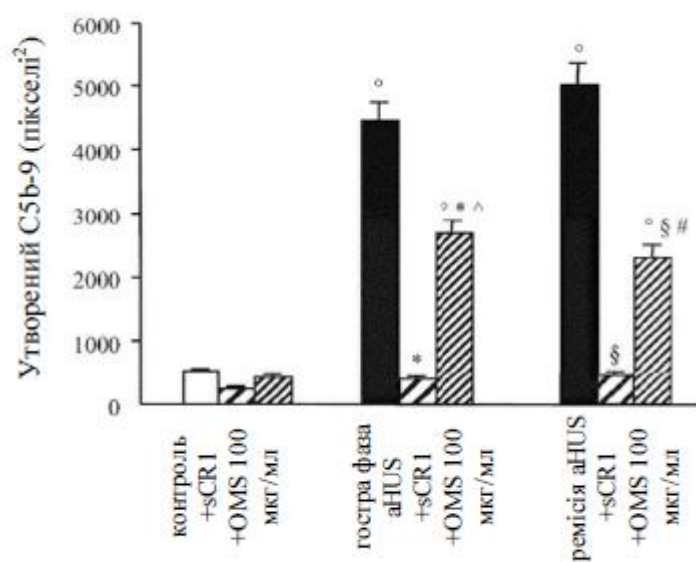


Fig. 55A



Фіг. 55В



Фіг. 56

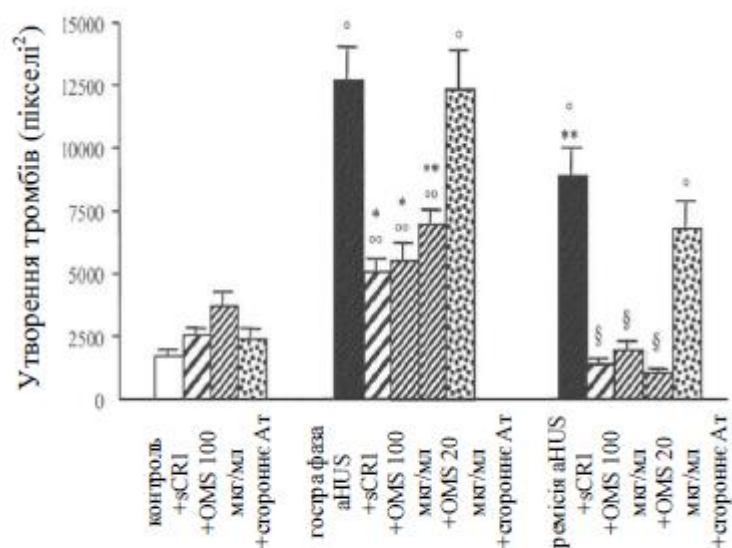


Fig. 57

**Зміна кількості тромбоцитів від вихідного значення з
плином часу**

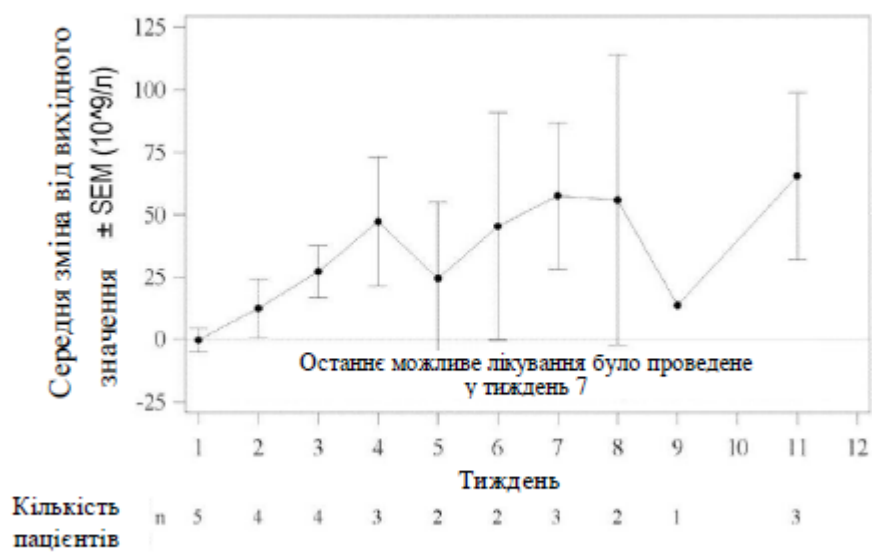


Fig. 58

Зміна LDH від вихідного значення з плином часу

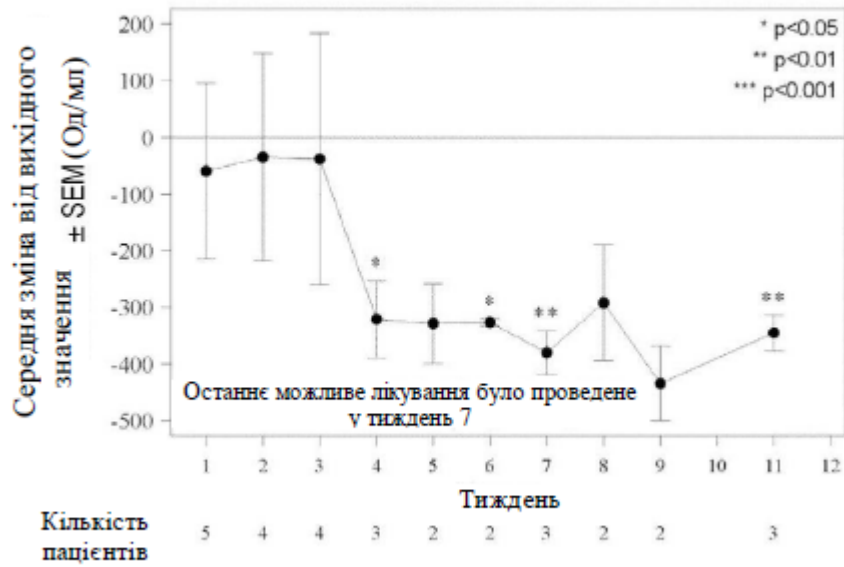


Fig. 59

Зміна рівня гаптоглобіну з плином часу

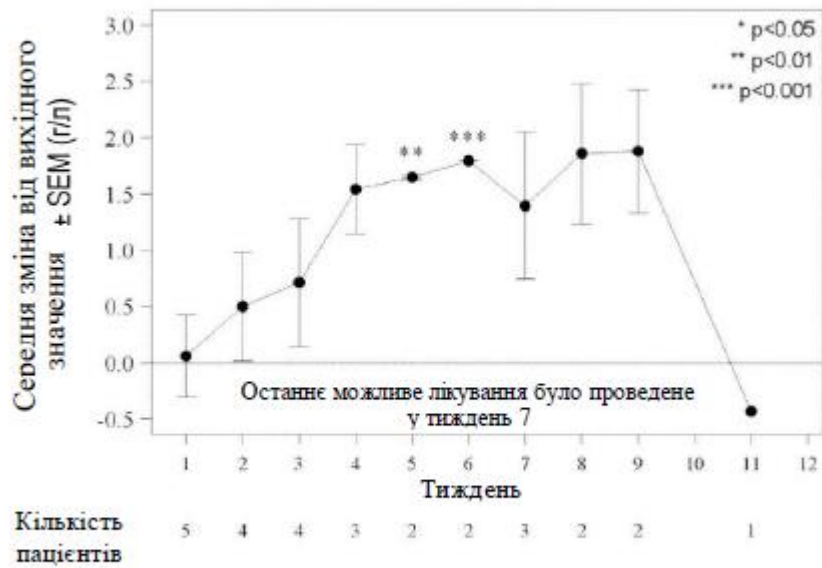


Fig. 60



Fig. 61

Лікування зі співчуття пацієнтки № 1: креатинін

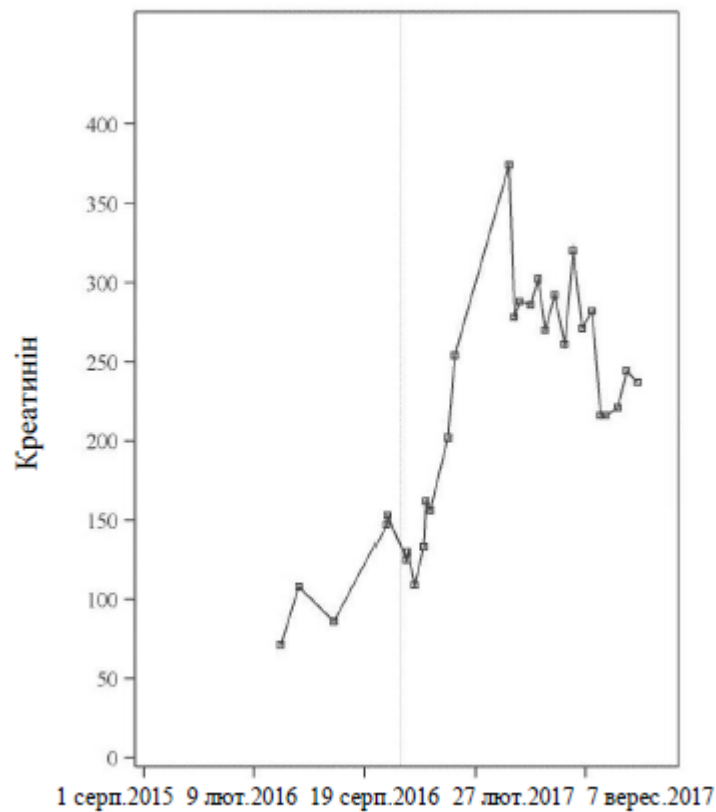
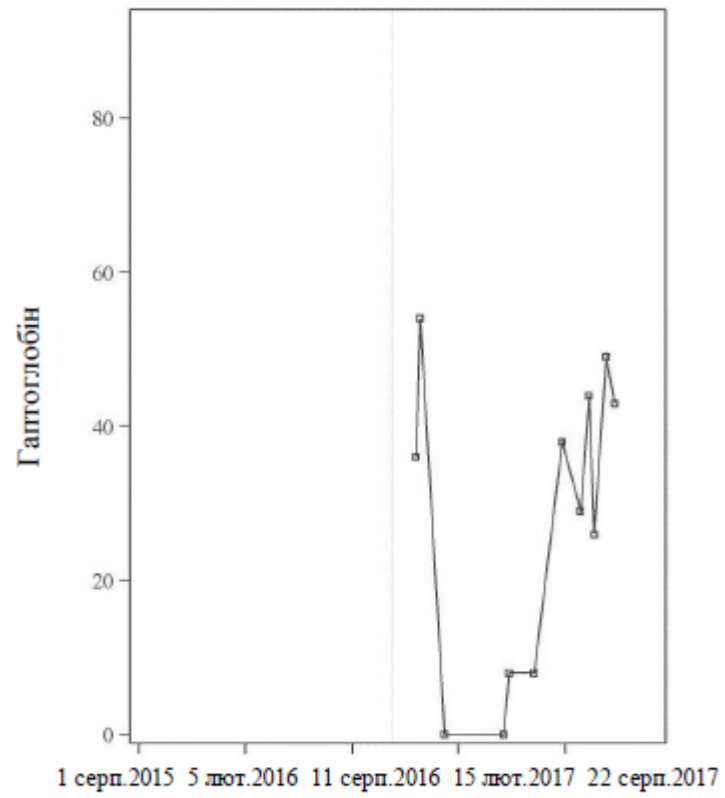


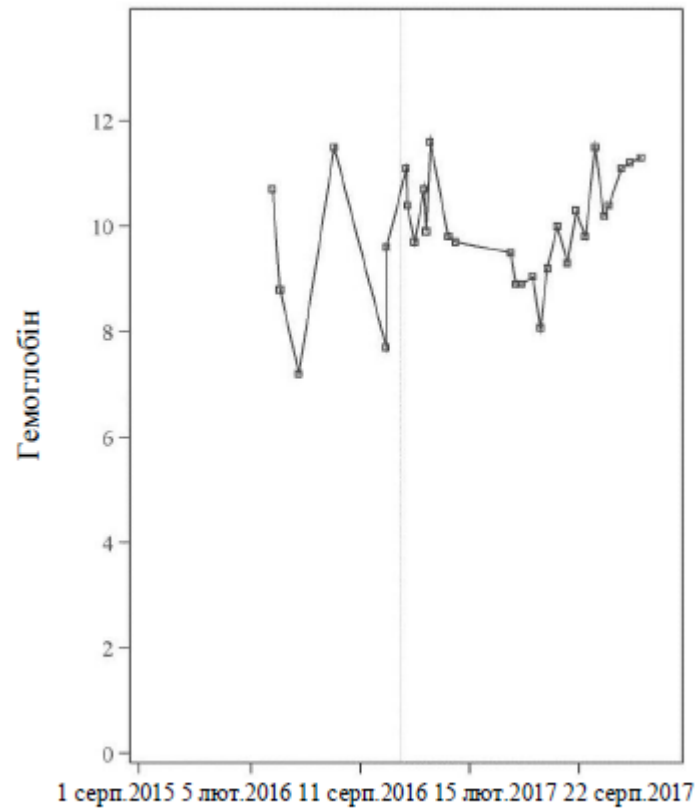
Fig. 62A

Лікування зі співчуття пацієнтки № 1: гаптоглобін



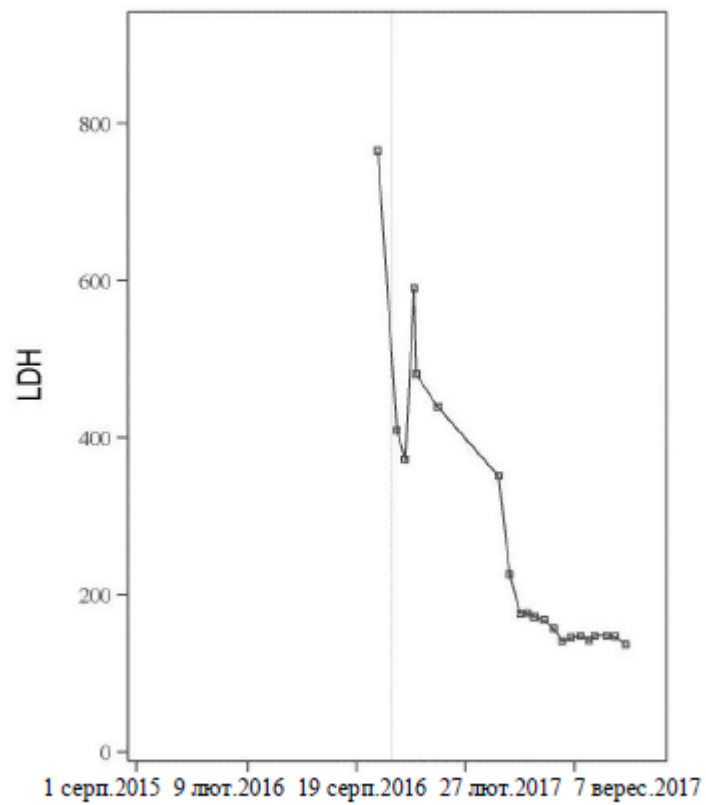
Фіг. 62В

Лікування зі співчуття пацієнтки № 1: гемоглобін



Фіг. 62С

Лікування зі співчуття пацієнтки № 1: LDH



Фіг. 62D

Лікування зі співчуття пацієнтки № 1: тромбоцити

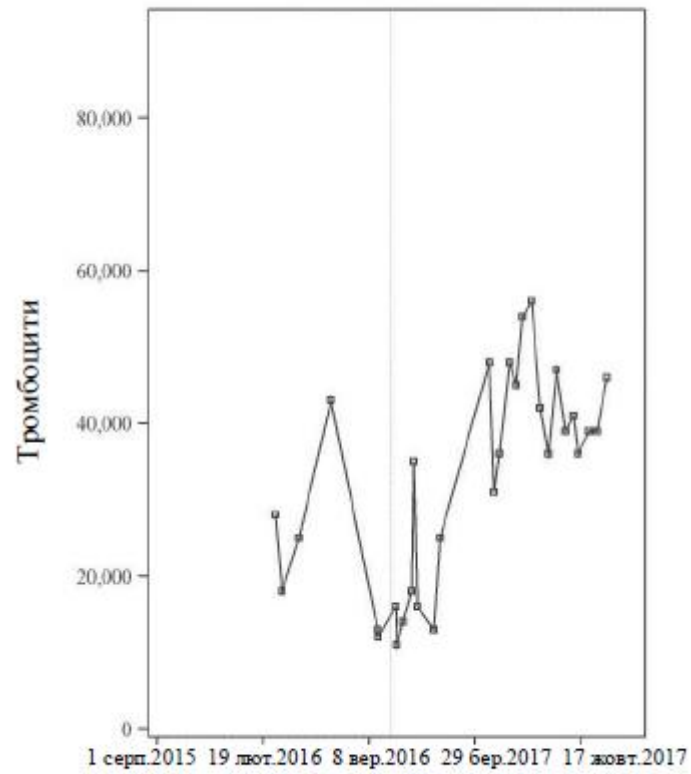


Fig. 62E