

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491505 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.01(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.12.07

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ДОМЕНОМ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ MASP-2, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/288,174; 63/350,580

(72) Изобретатель:

(32) 2021.12.10; 2022.06.09

Дадлер Томас, Ноллерт Фон Шпехт
Петер Курт, Ябуки Мунехиса, Ясин
Садам (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/081121

(87) WO 2023/108028 2023.06.15

(74) Представитель:

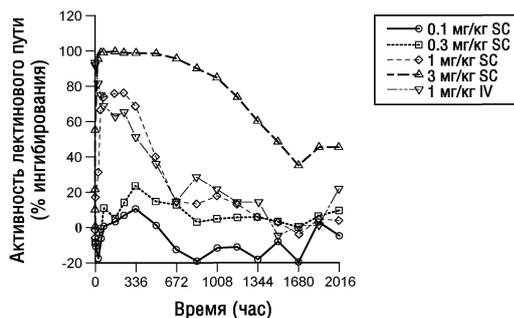
(88) 2023.09.21

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

(57) Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с эпитопом внутри домена сериновой протеазы MASP-2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют лектиновый путь активации комплемента. Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим описанные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и к клонирующим векторам или экспрессирующим кассетам, содержащим такие полинуклеотиды. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам ингибирования лектинового пути активации комплемента и к способам лечения связанных с лектиновым путем заболеваний и нарушений.



A1

202491505

202491505

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581300EA/019

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ДОМЕНОМ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ MASP-2, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающим домен сериновой протеазы MASP-2, и к родственным композициям и способам.

ПОЛОЖЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, ассоциированный с этой заявкой, представлен в формате XML вместо бумажной копии, и его содержание, таким образом, включено в описание в качестве ссылки. Наименование файла XML, содержащего список последовательностей, представляет собой MP10329PCT.XML; файл XML составляет 89 Кб, создан 21 ноября 2022 г.; и принят через патентный центр при подаче описания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента поддерживает врожденную защиту хозяина против патогенов и других острых повреждений (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York), а также играет роль в иммунологическом надзоре за злокачественными опухолями (P. Masor, et al., *Front. Immunol.*, 9:2203, 2018). Более чем 30 белков жидкой фазы и связанных с мембраной белков вовлечены в систему комплемента (S. Meyer, et al., *mAbs*, 6:1133, 2014). Большинство из них представляют собой регуляторные белки, управляющие строго регулируемым каскадом событий активации. Система комплемента быстро отвечает на молекулярные сигналы стресса через каскад последовательных протеолитических реакций, инициируемых посредством связывания узнающих паттерн рецепторов (PRR) с отдельными структурами на поврежденных клетках, поверхностях биологического материала или проникающих микроорганизмах (Reis et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 18:5, 2018). Активация каскада реакций комплемента индуцирует разнообразные иммуноэффекторные функции, такие как лизис клеток, фагоцитоз, хемотаксис и иммунная активация (S. Meyer, et al., 2014). Кроме того, система комплемента также действует в качестве мостика между врожденным иммунным ответом и последующей активацией адаптивного иммунитета. В дополнение к своим противомикробным свойствам, система комплемента также вовлечена в клиренс иммунных комплексов и апоптотических клеток, регенерацию тканей, мобилизацию гематопоэтических клеток-предшественников и ангиогенез (T.M. Pierpont et al., *Front. Oncol.*, 8:163, 2018).

Система комплемента может быть активирована посредством трех отдельных путей: классического пути, альтернативного пути и лектинового пути. См. ФИГУРУ 1.

Классический путь (CP) в основном запускается посредством комплексов антитело-антиген. Антитела подклассов IgM и IgG связываются с антигеном на поверхности патогена или клетки-мишени и привлекают комплекс C1, состоящий из мультимолекулярного узнающего подкомпонента C1q (состоящего из шести

гетеротримеров из А-цепи, В-цепи и С-цепи C1q) и ассоциированных с C1q сериновых протеаз, т.е. C1r и C1s. При связывании C1q с областью Fc либо IgM, связанного с антигеном, либо по меньшей мере двух антител IgG, связанных с их антигенами, сериновая протеаза C1r аутоактивируется до своей ферментативно активной формы, и затем расщепляет и активирует свой субстрат, C1s. После активации, C1s расщепляет C4 на его фрагменты C4a и C4b. C2 связывается с C4b, образуя комплекс C4bC2. На второй стадии расщепления, C1s расщепляет C2 внутри комплекса C4bC2, высвобождая C2b, с образованием конвертирующего компонент комплемента C3 ферментного комплекса C4bC2a, так называемой конвертазы C3, которая расщепляет присутствующий в большом количестве компонент комплемента C3 плазмы на C3a и C3b.

Лектиновый путь запускается посредством связывания узнающих паттерн молекул, таких как связывающий маннозу лектин (MBL), фиколины или коллектин-11 и коллектин-10, с ассоциированными с патогенами молекулярными паттернами (PAMP), или апоптотическими или измененными клетками-хозяевами. Узнающие молекулы формируют комплекс с ассоциированными с MBL сериновыми протеазами, MASP-1 и MASP-2, и активируют их при связывании с родственными им лигандами. Активированная MASP-2 расщепляет C4 и связанный с C4b C2 с формированием конвертазы C3 (C4bC2a).

Альтернативный путь запускается посредством спонтанного гидролиза C3 («вхолостую») до C3(H₂O), которая связывается с фактором В (fB). Превращение полученных комплексов C3(H₂O)fB в ферментативно активную конвертазу C3 требует ферментативной активности другой высокоспецифической сериновой протеазы, называемой фактор комплемента D. Считают, что доступность ферментативно активного фактора D является ограничивающим фактором для усиливающей петли альтернативного пути, и доступность фактора D требует действия другого фермента, MASP-3, который является необходимым для превращения про-фактора D (proCFD) в его активную форму, зрелый фактор D (matCFD, или просто CFD) (Dobó et al., 2016). CFD активирует связанный с C3(H₂O) fB до Ba и Bb. Bb также представляет собой сериновую протеазу и участвует в формировании конвертазы C3 альтернативного пути C3(H₂O)Bb, которая расщепляет C3 до C3a и C3b. Посредством этого механизма, альтернативный путь является конститутивно активным на низких уровнях. Усиливающая петля AP образуется, когда только что полученный C3b, образованный либо посредством C3(H₂O)Bb, либо посредством конвертазы C3 лектинового и классического пути, C4bC2a, связывается с поверхностями мишеней, таких как бактериальные клетки, и секвестрирует fB с формированием комплексов C3bfB, которые, при расщеплении посредством CFD, образуют комплекс конвертазы C3 альтернативного пути, C3bBb. Эта конвертаза может быть дополнительно стабилизирована посредством пропердина, что предотвращает распад комплекса и превращение C3b посредством фактора I и кофакторов.

Три пути сходятся на стадии активации C3. Фрагмент C3a после расщепления C3 представляет собой анафилатоксин, стимулирующий воспаление. C3b функционирует в

качестве опсонина посредством ковалентного связывания через свою тиоэфирную связь на поверхности клеток-мишеней, помечая их для циркулирующих экспонирующих рецептор комплемента (CR) эффекторных клеток, таких как клетки естественные киллеры (NK) и макрофаги, которые вносят вклад в комплементзависимую клеточную цитотоксичность (CDCC) и комплементзависимый клеточный фагоцитоз (CDCP), соответственно. C3b также связывается с конвертазой C3 (либо C4bC2a, либо C3bBb) с формированием конвертазы C5 (C4bC2a (C3b)_n или C3bBb(C3b)_n, соответственно), что приводит к формированию MAC и последующей CDC. Кроме того, связанные с клетками фрагменты деградации, C3b, iC3b и C3dg, могут стимулировать опосредованную рецептором комплемента цитотоксичность (CDCC и CDCP), так же как адаптивный иммунный ответ, посредством активации В-клеток (M.C. Carroll, *Nat. Immunol.*, 5:981, 2004).

Образование конвертазы C5 приводит к расщеплению C5 на C5a и C5b. C5a представляет собой другой анафилатоксин. C5b привлекает C6-9 для формирования мембраноатакующего комплекса (MAC, или комплекса C5b-9). Комплекс MAC вызывает образование пор, приводящее к разрушению мембраны клетки-мишени и лизису клетки (так называемая комплементзависимая цитотоксичность, CDC). Прямой лизис клеток посредством формирования MAC традиционно признан в качестве терминального эффекторного механизма системы комплемента, однако, считают, что опосредованные C3b опсонизация и передача провоспалительных сигналов, так же как функция анафилатоксина C3a, играют важную роль в опосредовании комплементзависимой воспалительной патологии.

В то время как активация комплемента обеспечивает значительную защиту первой линии против потенциальных патогенов, виды активности комплемента, которые стимулируют защитный иммунный ответ, также могут представлять потенциальную угрозу для хозяина (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417-431, 1994; В.Р. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* 24:219-228, 1994). Например, протеолитические продукты C3 и C5 привлекают и активируют нейтрофилы. В то время как они являются неотъемлемой частью защиты хозяина, активированные нейтрофилы являются неизбежными в своем высвобождении деструктивных ферментов и могут вызывать повреждение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать накопление литических компонентов комплемента поблизости от клеток-хозяев, так же как на микроорганизмах-мишенях, приводя к лизису клетки-хозяина.

Система комплемента вовлечена также в патогенез многочисленных острых и хронических состояний заболевания, включая: инфаркт миокарда, инсульт, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), осложнения, ассоциированные с диабетом, ишемически-реперфузионное повреждение, воспалительные желудочно-кишечные нарушения, септический шок, подтекание капилляров после термических ожогов, реакцию трансплантат против хозяина, офтальмологические нарушения, воспаление после операции в условиях искусственного кровообращения, отторжение трансплантата,

тромботическую микроангиопатию (ТМА), почечные нарушения, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, миастению гравис и болезнь Альцгеймера. Активация комплемента может являться главным патологическим механизмом в этих и других заболеваниях, и представляет собой эффективную точку для клинического контроля во многих из этих состояний заболевания. Растущее понимание важности опосредованного комплементом повреждения тканей во множестве состояний заболевания подчеркивает необходимость эффективных ингибирующих комплемент лекарственных средств. До настоящего времени, экулизумаб (солирис®), равулизумаб (ультомирис), оба антитела против C5, и пэгцетакоплан (эмпавели), ингибитор C3, являются исключительными тремя нацеленными на комплемент лекарственными средствами, которые были одобрены для применения у человека. В то же время, C5 и C3 представляют собой эффекторные молекулы, локализованные «ниже» в системе комплемента, и блокирование C5 или ингибирование C3 не ингибирует активацию системы комплемента. Таким образом, ингибитор начальных стадий активации комплемента может иметь значительные преимущества, по сравнению с «нижестоящим» ингибитором комплемента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Это краткое изложение сущности изобретения приведено для представления в упрощенной форме набора концепций, которые дополнительно описаны ниже в подробном описании. Это краткое изложение сущности изобретения как не предназначено для идентификации ключевых признаков заявленного объекта изобретения, так и не предназначено для использования в качестве вспомогательного средства для определения объема заявленного объекта изобретения.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с MASP-2. В некоторых вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом внутри домена сериновой протеазы MASP-2 человека. В некоторых вариантах осуществления, указанный эпитоп расположен в пределах аминокислот ₄₉₆DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO:6) MASP-2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует лектиновый путь активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с C4 за связывание с MASP-2.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим описанные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и к клонирующим векторам или экспрессирующим кассетам, содержащим такие полинуклеотиды.

Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, экспрессирующим описанные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и к способам их получения, включающим культивирование клеток-хозяев в

условиях, позволяющих экспрессию антител или их антигенсвязывающих фрагментов, и выделение антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего, включающим введение нуждающемуся в этом субъекту-млекопитающему некоторого количества композиции, содержащей описанные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в количестве, достаточном для ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, описанные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для лечения субъекта, страдающего от или подверженному риску развития связанного с лектиновым путем заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из тромботической микроангиопатии (ТМА), почечного нарушения, воспалительной реакции, возникающей в результате трансплантации ткани или органа, ишемически-реперфузионного повреждения, осложнения, ассоциированного с диабетом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-кишечного нарушения, легочного нарушения, офтальмологического заболевания или нарушения, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, реакции трансплантат против хозяина, веноокклюзионного заболевания и диффузного альвеолярного кровоизлияния.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеупомянутые аспекты и множество сопутствующих преимуществ этого изобретения смогут быть быстрее оценены, по мере того как станут более доступными для понимания путем ссылки на нижеследующее подробное описание, рассмотренное в сочетании с прилагаемыми чертежами, где:

ФИГУРА 1 представляет собой схематическую диаграмму системы комплемента

ФИГУРА 2 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую доменную структуру белка MASP-2 человека.

ФИГУРА 3 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности областей VH и VL ингибирующих антител против MASP-2 (исходных мышинных) mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 2.

На ФИГУРЕ 4 графически проиллюстрировано связывание MASP-2 человека (фрагмента CCP1-CCP2-SP) посредством mAb OMS850; mAb OMS860; mAb OMS870; и mAb OMS858, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 5А графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления C3b в сыворотке человека посредством mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 5В графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления C3b в сыворотке яванского макака посредством mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 5С графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С3b в сыворотке крысы посредством mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 5D графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С3b в сыворотке мыши посредством mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 6 графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С4b в 50% сыворотке человека посредством mAb OMS850; mAb OMS860 и mAb OMS870, как описано в примере 3.

На ФИГУРЕ 7 графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С3b в сыворотке человека для mAb OMS852 с различными заменами P53, как описано в примере 4.

На ФИГУРЕ 8А графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С3b в сыворотке человека для нескольких гуманизированных вариантов-кандидатов mAb OMS850, как описано в примере 4.

На ФИГУРЕ 8В графически проиллюстрировано зависимое от концентрации ингибирование накопления С3b в сыворотке человека для нескольких гуманизированных вариантов-кандидатов mAb OMS850, как описано в примере 4.

На ФИГУРЕ 9А графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для классического пути, как описано в примере 5.

На ФИГУРЕ 9В графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для лектинового пути, как описано в примере 5.

На ФИГУРЕ 9С графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для альтернативного пути, как описано в примере 5.

На ФИГУРЕ 10 показаны результаты исследования в устройстве (ОСТЕТ) для интерферометрии биослоя (BLI) с использованием биотинилированного OMS858 и панели других антител против MASP-2, как описано в примере 6.

ФИГУРА 11 представляет собой схематическую диаграмму, показывающую аранжировку домена сериновой протеазы MASP-2 и Fab mAb OMS858, и контакты между ними, как описано в примере 9.

ФИГУРА 12 представляет собой схематическую диаграмму, показывающую на левой стороне эпитоп MASP-2, с которым связывается mAb OMS858, включающий следующие остатки в домене SP MASP-2: ASP496; LYS503; SER506; PRO507; HIS508 и TRP513; и на правой стороне, паратоп mAb OMS858, который связывается с эпитопом MASP-2, где паратоп охватывает два соединенных, соответствующих отрезка, в которые вносят вклады тяжелая и легкая цепь, и в частности, остатки тяжелой цепи HIS33; ASP50;

ASP52; ASP55; GLU57; HIS59 и остатки легкой цепи TYR31; ARG30 и TRP90, как описано в примере 9.

На ФИГУРЕ 13 проиллюстрированы взаимодействия между паратопом mAb OMS858 и эпитопом MASP-2, как вычислено посредством программного обеспечения LigPlot+, как описано в примере 9.

На ФИГУРЕ 14А проиллюстрирована трехмерная структура эпитопа MASP-2, содержащего ASP496, LYS503, SER506, PRO507, HIS508 и TRP513, с которыми связывается mAb OMS858, как описано в примере 9.

На ФИГУРЕ 14В проиллюстрирована трехмерная структура паратопа mAb OMS858, содержащего HIS33, ASP50, ASP52, ASP55, GLU57, HIS59 тяжелой цепи, и ARG30, TYR31 и TRP90 легкой цепи, с которым связывается MASP-2, как описано в примере 9.

На ФИГУРЕ 15 проиллюстрированы контакты между эпитопом MASP-2 DIRMGTLKRLSPHYTQAW (SEQ ID NO:6), и вариательной областью тяжелой цепи и вариательной областью легкой цепи mAb OMS858, как описано в примере 9.

ФИГУРА 16 представляет собой выравнивание аминокислот домена сериновой протеазы (SP) MASP-2 из MASP-2 человека (ак 445-686 из SEQ ID NO:1); MASP-2 яванского макака (ак 445-686 из SEQ ID NO:4); MASP-2 собаки (ак 445-686 из SEQ ID NO:5); MASP-2 мыши (ак 444-685 из SEQ ID NO:2); и MASP-2 крысы (ак 444-685 из SEQ ID NO:3), показывающее, что HIS508 из MASP-2 человека является консервативным у яванского макака, мыши и крысы, но не собаки, как описано в примере 10.

На ФИГУРЕ 17А графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после внутривенного введения 1,5 мг/кг OMS856, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 17В графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после внутривенного введения 1,5 мг/кг OMS858, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 18А графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после подкожного введения 1,5 мг/кг OMS856, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 18В графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после подкожного введения 1,5 мг/кг OMS858, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 19 графически проиллюстрировано время до окклюзии (ТОС) у мышей, подвергнутых введению диапазона доз OMS858, как описано в примере 12.

На ФИГУРЕ 20А графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для классического пути, как описано в примере 13.

На ФИГУРЕ 20В графически проиллюстрирован уровень накопления МАС в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для лектинового пути, как описано в примере 13.

На ФИГУРЕ 20С графически проиллюстрирован уровень накопления МАС в присутствии различных концентраций антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для альтернативного пути, как описано в примере 13.

На ФИГУРЕ 21 графически проиллюстрирована фармакодинамика ингибирования посредством OMS858 активности лектинового пути у яванских макаков после подвергания воздействию 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг SC OMS858, или 1 мг/кг IV OMS585, как описано в примере 16.

На ФИГУРЕ 22 графически проиллюстрирована взаимосвязь между концентрацией в сыворотке OMS858 и данными PD ответа (т.е., ингибирования лектинового пути) у яванских макаков, как описано в примере 16.

На ФИГУРЕ 23 графически проиллюстрированы фармакокинетические параметры OMS858 у мышей и у яванских макаков после подвергания воздействию 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг SC OMS858, или 1 мг/кг IV OMS585, как описано в примере 17. Показаны графики средней концентрации в сыворотке OMS858 с течением времени после однократного IV или SC введения мышам (левая панель) и обезьянам (правая панель).

На ФИГУРЕ 24 графически проиллюстрирована фармакодинамика ингибирования посредством OMS858 активности лектинового пути у мышей после подвергания воздействию 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг SC OMS858, или 1 мг/кг IV OMS585, как описано в примере 16.

На ФИГУРЕ 25 графически проиллюстрирована фармакокинетика (PK) OMS858 у здоровых субъектов-людей. Субъектам вводили одну IV дозу OMS858 при 0,01 мг/кг (когорта 1), 0,03 мг/кг (когорта 2), 0,1 мг/кг (когорта 3) или 0,3 мг/мл (когорта 4). Показаны концентрации OMS858, детектированные в образцах сыворотки от субъектов в различных временных точках после введения. Пунктирной линией показан нижний предел количественного определения для используемого анализа, который составляет 70 нг/мл.

На ФИГУРЕ 26 графически проиллюстрирована фармакодинамика (PD) OMS858 у здоровых субъектов-людей. Субъектам вводили одну IV дозу OMS858 при 0,01 мг/кг (когорта 1), 0,03 мг/кг (когорта 2), 0,1 мг/кг (когорта 3) или 0,3 мг/кг (когорта 4). Показан уровень ингибирования лектинового пути комплемента, как измерено посредством накопления C4, в различных временных точках после введения. Показаны также измерения для субъектов, подвергнутых введению плацебо.

На ФИГУРЕ 27 графически проиллюстрирована взаимосвязь PK и PD для OMS858. Уровень ингибирования лектинового пути при различных уровнях OMS858 показан для субъектов, подвергнутых введению одной IV дозы OMS858 при 0,01 мг/кг (когорта 1), 0,03 мг/кг (когорта 2) или 0,1 мг/кг (когорта 3). Рассчитанная EC_{50} составляет 170 нг/мл, и рассчитанная EC_{90} составляет 400 нг/мл.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

Если в настоящем описании конкретно не определено иное, все термины, используемые в настоящем описании, имеют то же самое значение, какое понятно специалисту в области настоящего изобретения. Следующие определения представлены с целью внесения ясности в отношении терминов, как их используют в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения. Дополнительные определения приведены на протяжении настоящего описания.

В настоящем описании, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, где это применимо, его доли (такие как одна десятая и одна сотая от целого числа), если иное не указано или не очевидно из контекста. Любой числовой диапазон, указанный в настоящем описании, относящийся к любому физическому признаку, такому как количество субъединиц полимера, размер или толщина, следует понимать как включающий любое целое число в пределах указанного диапазона и, где это применимо, его доли, если иное не указано или не очевидно из контекста. В рамках изобретения, термин «приблизительно» предназначен для указания того, что представленные диапазон или значение могут изменяться на $\pm 10\%$ от указанного диапазона или значения, если не указано иное.

Следует понимать, что термины единственного числа, в рамках изобретения, относятся к одному или нескольким из указанных компонентов. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать для обозначения любой из одной, двух или любой комбинации альтернатив. В рамках изобретения, термины «включают», «имеют» и «содержат» использованы в качестве синонимов, причем эти термины и их варианты предназначены для интерпретации как неограничивающие.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что описанные затем элемент, компонент, событие или условие могут присутствовать или могут не присутствовать, и что описание включает случаи, в которых элемент, компонент, событие или условие присутствуют, и случаи, в которых они не присутствуют.

Следует понимать, что индивидуальные конструкции или группы конструкций, происходящие из различных комбинаций структур и субъединиц, описанных в настоящем описании, раскрыты посредством настоящей заявки в такой же степени, как если бы каждая конструкция или группа конструкций была приведена индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных субъединиц включен в объем настоящего изобретения.

Термин «в основном состоящий из» не является эквивалентным «содержащему» и обозначает указанные материалы или стадии из пункта формулы изобретения, или те, которые существенно не влияют на основные характеристики заявленного объекта изобретения. Например, домен, область или модуль (например, связывающий домен) белка, или белок, «в основном состоит из» конкретной аминокислотной

последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации, или их комбинацию (например, аминокислоты на амино- или карбокси-конце или между доменами), которые, в комбинации, составляют, самое большее, 20% (например, самое большее, 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) от длины домена, области, модуля или белка и существенно не влияют (т.е., не уменьшают активность более, чем на 50%, например, не более, чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) на активность домен(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, аффинность связывания с мишенью связывающего белка).

В рамках изобретения, термины «лечить», «лечение», или «облегчать» относятся к медицинскому управлению течением заболевания, нарушения или состояния субъекта. Как правило, подходящую дозу или режим лечения, включающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, используют в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического или профилактического преимущества. Терапевтическое или профилактическое/предупредительное преимущество включает улучшенный клинический исход; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; уменьшенную встречаемость симптомов; улучшенное качество жизни; более длительный статус отсутствия заболевания; уменьшение степени заболевания, стабилизацию состояния заболевания; задержку или предотвращение прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; продленную выживаемость; или любую их комбинацию.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению относится к количеству композиции или молекулы, достаточному для оказания терапевтического эффекта, включая улучшенный клинический исход; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; уменьшенную встречаемость симптомов; улучшенное качество жизни; более длительный статус отсутствия заболевания; уменьшение степени заболевания, стабилизацию состояния заболевания; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; или продленную выживаемость, статистически значимым образом. При упоминании индивидуального активного ингредиента, вводимого отдельно, терапевтически эффективное количество относится только к эффектам этого ингредиента или клетки, экспрессирующей этот ингредиент. При упоминании комбинации, терапевтически эффективное количество относится к объединенным количествам активных ингредиентов или вспомогательного активного ингредиента, объединенного с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, оказывающим терапевтический эффект, независимо от того, вводят ли их серийно, последовательно или одновременно.

В рамках изобретения, «субъект» включает всех млекопитающих, включая, без ограничения, человека, нечеловекообразных приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз,

коров, кроликов, свиней и грызунов. Субъект может иметь мужской или женский пол и может находиться в любом подходящем возрасте, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и престарелых субъектов.

В рамках изобретения, «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, так же как к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют сходным образом с природными аминокислотами. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, так же как аминокислоты, модифицированные позднее, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, имеющим такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е., α -атом углерода, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и группу R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют сходным образом с природными аминокислотами.

В рамках изобретения, «мутация» относится к изменению в последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы полипептида, по сравнению с эталонной или относящейся к дикому типу молекулой нуклеиновой кислоты или молекулой полипептида, соответственно. Мутация может приводить к нескольким различным типам изменений последовательности, включая замену, вставку или делецию нуклеотида(ов) или аминокислот(ы).

В самом широком смысле, природные аминокислоты можно разделять на группы на основании химических характеристик боковых цепей соответствующих аминокислот. Под «гидрофобной» аминокислотой понимают Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. Под «гидрофильной» аминокислотой понимают Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His.

«Консервативная замена» относится к аминокислотным заменам, не подвергающим значительному влиянию или изменению характеристики связывания конкретного белка. Как правило, консервативные замены представляют собой замены, при которых замененный аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Консервативные замены включают замену, обнаруженную в одной из следующих групп: группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V); и группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно

или альтернативно, аминокислоты можно группировать в группы консервативных замен по сходным функции, химической структуре или составу (например, кислые, основные, алифатические, ароматические или содержащие серу). Например, алифатическая группировка может включать, для целей замены, Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают: содержащие серу: Met и цистеин (Cys или C); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; небольшие алифатические, неполярные или слабо полярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; большие алифатические, неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и большие ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно обнаружить в Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

В рамках изобретения, «белок» или «пептид», или «полипептид» относится к полимеру из аминокислотных остатков. Белки применимы к природным аминокислотным полимерам, так же как к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, и к неприродным аминокислотным полимерам. Предусматривают также варианты белков, пептидов и полипептидов по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления, варианты белков, пептидов и полипептидов содержат или состоят из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичной аминокислотной последовательности определенной или эталонной аминокислотной последовательности, как описано в настоящем описании.

«Молекула нуклеиновой кислоты» или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид», или «полинуклеиновая кислота» относится к олигомерному или полимерному соединению, включающему ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут состоять из природных субъединиц (например, пуриновых или пиримидиновых оснований) или неприродных субъединиц (например, морфолинового кольца). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, и пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Молекулы нуклеиновых кислот включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), которая включает, например, мРНК, микроРНК, миРНК, вирусную геномную РНК и синтетическую РНК, и полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает, например, кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. Как РНК, так и ДНК может являться одно- или двухцепочечной. Если она является одноцепочечной, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой кодирующую цепь или не кодирующую (антисмысловую) цепь. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, кодирующие одинаковую аминокислотную последовательность. Некоторые варианты нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон(ы) в той степени, чтобы интрон(ы) могли быть удалены посредством ко- или

посттранскрипционных механизмов. Иными словами, различные нуклеотидные последовательности могут кодировать одинаковую аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода, или посредством сплайсинга.

Предусматривают также варианты молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Варианты молекул нуклеиновых кислот являются по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, и являются, предпочтительно, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичными молекуле нуклеиновой кислоты определенного или эталонного полинуклеотида, как описано в настоящем описании, или гибридизуются с полинуклеотидом в строгих условиях гибридизации 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при приблизительно 65-68°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 50% формамид при приблизительно 42°C. Варианты молекулы нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать ее связывающий домен, имеющий функциональность, описанную в настоящем описании, такую как связывание молекулы-мишени.

«Процентная идентичность последовательностей» относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, как определено посредством сравнения последовательностей. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей разработаны для получения наилучшего совпадения между сравниваемыми последовательностями. Например, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, пропуски можно вводить в одну или обе из первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания). Кроме того, негомологичные последовательности можно не учитывать для целей сравнения. Процентную идентичность последовательностей, упомянутую в настоящем описании, рассчитывают на протяжении длины эталонной последовательности, если не указано иное. Способы определения идентичности и сходства последовательностей можно обнаружить в публично доступных компьютерных программах. Выравнивания последовательностей и расчеты процента идентичности можно проводить с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX) или программного обеспечения Megalign (DNASTAR). Математический алгоритм, используемый в программах BLAST, можно обнаружить в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997. Подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей, можно определять известными способами.

Термин «выделенный» означает, что материал удален из его исходного окружения (например, природного окружения, если он встречается в природе). Например, природные нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не являются выделенными, но такие же нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от некоторых или всех из совместно существующих в природной системе материалов,

являются выделенными. Такая нуклеиновая кислота может составлять часть вектора, и/или такие нуклеиновая кислота или полипептид могут составлять часть композиции (например, лизата клеток), и все еще являться выделенными в том отношении, что такие вектор или композиция не являются частью природного окружения для нуклеиновой кислоты или полипептида. «Выделенные» может, в некоторых вариантах осуществления, также описывать антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или композицию, находящиеся вне организма человека.

Термин «ген» означает отрезок ДНК или РНК, вовлеченный в продукцию полипептидной цепи; в конкретных контекстах, он включает области, предшествующие кодирующей области и следующие за кодирующей областью (например, 5'-нетранслируемую область (UTR) и 3'-UTR), так же как промежуточные последовательности (интроны) между индивидуальными кодирующими отрезками (экзонами).

«Функциональный вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который является структурно сходным или в основном структурно сходным с исходным или эталонным соединением по настоящему изобретению, но немного отличается по составу (например, одно или несколько из оснований, атомов или функциональных групп отличается, добавлено или удалено), так что полипептид или кодированный полипептид является способным осуществлять по меньшей мере одну функцию исходного полипептида с по меньшей мере 50% эффективностью, предпочтительно, с по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 100% уровнем активности исходного полипептида, или с уровнем активности, большим, чем у исходного полипептида. Иными словами, функциональный вариант полипептида или кодированного полипептида по настоящему изобретению имеет «сходное связывание», «сходную аффинность» или «сходную активность», когда для функционального варианта показано улучшение активности, или не более чем 50% уменьшение активности, в выбранном анализе, по сравнению с исходным или эталонным полипептидом, таком как анализ для измерения ферментативной активности или аффинности связывания.

В рамках изобретения, «функциональная часть» или «функциональный фрагмент» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который содержит только домен, часть или фрагмент исходного или эталонного соединения, и полипептид или кодированный полипептид сохраняет по меньшей мере 50% активности, ассоциированной с доменом, частью или фрагментом исходного или эталонного соединения, предпочтительно, по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 100% уровня активности исходного полипептида, или уровень активности, больший, чем у исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторную функцию). «Функциональная часть» или «функциональный фрагмент» полипептида или кодированного полипептида по настоящему изобретению имеет «сходное связывание» или «сходную активность», когда для функциональных части или фрагмента показано улучшение активности, или не более чем 50% уменьшение

активности, в выбранном анализе, по сравнению с исходным или эталонным полипептидом (предпочтительно, не более чем 20% или 10% уменьшение, или различие не более чем на логарифм, по сравнению с исходным или эталонным, применительно к аффинности).

В рамках изобретения, термин «сконструированный», «рекомбинантный» или «неприродный» относится к организму, микроорганизму, клетке, белку, полипептиду, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение или были модифицированы посредством введения экзогенной или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, где такие изменения или модификации введены посредством генной инженерии (т.е., вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации, вводящие поддающиеся экспрессии молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие функциональные РНК, белки, слитые белки или ферменты, или другие добавления, делеции, замены молекулы нуклеиновой кислоты, или другое функциональное нарушение генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, модификации в которых изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

В рамках изобретения, «гетерологичный» или «неэндогенный», или «экзогенный» относится к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются нативными для клетки или субъекта - хозяина, или к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, нативным для клетки или субъекта - хозяина, которые были изменены. Гетерологичные, неэндогенные или экзогенные включают гены, белки, соединения или молекулы нуклеиновых кислот, которые были подвергнуты мутагенезу или иным образом изменены, так что структура, активность или обе отличаются между нативными и измененными генами, белками, соединениями или молекулами нуклеиновых кислот. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот (например, рецепторы, лиганды и т.д.) могут не являться эндогенными для клетки или субъекта - хозяина, но вместо этого, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот, могли быть добавлены в клетку-хозяина посредством конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации или т.п., где добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрировать в геном клетки-хозяина или может существовать в форме внехромосомного генетического материала (например, в форме плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Термин «гомологичный» или «гомолог» относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, обнаруженным в клетке, виде или штамме - хозяине, или происходящим из них. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, может являться гомологичным нативному полинуклеотиду или гену и кодировать гомологичный полипептид или активность, но полинуклеотид или полипептид может иметь измененные

структуру, последовательность, уровень экспрессии, или любую их комбинацию. Неэндогенный полинуклеотид или ген, так же как кодированные полипептид или активность, могут происходить из того же самого вида, отличного вида или их комбинации.

В конкретных вариантах осуществления, молекулу нуклеиновой кислоты или ее часть, нативную для клетки-хозяина, можно считать гетерологичной для клетки-хозяина, если она была подвергнута изменению или мутагенезу, или молекулу нуклеиновой кислоты, нативную для клетки-хозяина, можно считать гетерологичной, если она была изменена с использованием гетерологичной последовательности для контроля экспрессии или была изменена с использованием эндогенной последовательности для контроля экспрессии, в норме не ассоциированной с молекулой нуклеиновой кислоты, нативной для клетки-хозяина. Кроме того, термин «гетерологичный» может относиться к биологической активности, которая является отличной, измененной или не эндогенной для клетки-хозяина. Как описано в настоящем описании, более одной гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетку-хозяина в форме отдельных молекул нуклеиновых кислот, в форме множества индивидуально контролируемых генов, в форме полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в форме одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент (или другой полипептид), или в любой их комбинации.

В рамках изобретения, термин «эндогенный» или «нативный» относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые в норме присутствуют в клетке-хозяине или у субъекта-хозяина.

Термин «экспрессия», в рамках изобретения, относится к процессу, посредством которого продуцируется полипептид на основании кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Этот процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию. Экспрессируемая молекула нуклеиновой кислоты является, как правило, функционально связанной с последовательностью для контроля экспрессии (например, промотором).

Термин «функционально связанные» относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновых кислот на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, таким образом, что на функцию одной влияет другая. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, когда он является способным влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е., кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). «Несвязанные» означает, что ассоциированные генетические элементы не являются тесно ассоциированными друг с другом, и функция одного не влияет на другой.

Как описано в настоящем описании, более одной гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетку-хозяина в форме отдельных молекул

нуклеиновых кислот, в форме множества индивидуально контролируемых генов, в форме полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в форме одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок (например, тяжелую цепь антитела), или в любой их комбинации. Когда две или более гетерологичные молекулы нуклеиновых кислот вводят в клетку-хозяина, понятно, что две или более гетерологичные молекулы нуклеиновых кислот можно вводить в форме одиночной молекулы нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе), в отдельных векторах, интегрированными в хромосому хозяина в одном участке или во множестве участков, или в любой их комбинации. Количество указанных гетерологичных молекул нуклеиновых кислот или видов активности белка относится к количеству различных кодирующих молекул нуклеиновых кислот или к количеству различных видов активности белка, не к количеству отдельных молекул нуклеиновых кислот, введенных в клетку-хозяина.

Термин «конструкция» относится к любому полинуклеотиду, содержащему рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты (или, когда явно указано в контексте, к слитому белку по настоящему изобретению). (Полинуклеотидная) конструкция может присутствовать в векторе (например, бактериальном векторе, вирусном векторе) или может являться интегрированной в геном. «Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является способной к транспортировке другой молекулы нуклеиновой кислоты. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды, космиды, вирусы, РНК-вектор или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которые могут включать хромосомные, нехромосомные, полусинтетические или синтетические молекулы нуклеиновых кислот. Векторы по настоящему изобретению также включают системы транспозонов (например, *Sleeping Beauty*, см., например, Geurts et al., *Mol. Ther.* 8:108, 2003; Mátés et al., *Nat. Genet.* 41:753, 2009). Иллюстративные векторы представляют собой векторы, способные к автономной репликации (эписомный вектор), способные к доставке полинуклеотида в геном клетки (например, вирусный вектор) или способные к экспрессии молекул нуклеиновых кислот, с которыми они связаны (экспрессирующие векторы).

В рамках изобретения, «экспрессирующий вектор», «клонированный вектор» или «вектор» относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая является функционально связанной с подходящей контрольной последовательностью, способной к осуществлению экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности, как правило, включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную операторную последовательность для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосом на мРНК, и последовательности, контролируемые терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации подходящего хозяина, вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина, или может, в некоторых случаях, сам

интегрировать в геном или доставлять полинуклеотид, содержащийся в векторе, в геном без векторной последовательности. В настоящем описании, «плазмида», «экспрессирующая плазмида», «вирус» и «вектор» часто используются взаимозаменяемо.

Термин «введенный», в контексте вставки молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, означает «трансфекцию», «трансформацию» или «трансдукцию» и включает ссылку на встраивание молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекулу нуклеиновой кислоты можно встраивать в геном клетки (например, хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную ДНК), переводить в автономный репликон или временно экспрессировать (например, трансфицированную мРНК).

В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут являться функционально связанными с конкретными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, являющиеся необходимыми для влияния на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут являться функционально связанными. Последовательности для контроля экспрессии могут включать подходящие последовательности для инициации, терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, улучшающие эффективность трансляции (т.е., консенсусные последовательности Козак); последовательности, улучшающие стабильность белка; и возможно, последовательности, улучшающие секрецию белка. Последовательности для контроля экспрессии могут являться функционально связанными, если они являются непрерывными с представляющим интерес геном, и последовательности для контроля экспрессии, которые действуют в транс-положении или на расстоянии для контроля представляющего интерес гена, также можно считать функционально связанными.

В конкретных вариантах осуществления, вектор содержит плазмидный вектор или вирусный вектор (например, лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор). Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, кори и Сендай), РНК-вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины, оспы кур и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норфолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают вирус лейкоза-саркомы птиц, вирусы млекопитающих С-типа, В-типа, вирусы D-типа, группу HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N.

Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Способы использования ретровирусных и лентивирусных вирусных векторов и упаковывающих клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены, известны в данной области и были описаны ранее, например, в: Патенте США 8119772; Walchli et al., PLoS One 6:327930, 2011; Zhao et al., J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010; и Verhoeven et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также являются коммерчески доступными. Другие вирусные векторы также можно использовать для доставки полинуклеотидов, включая вирусные ДНК-векторы, включая, например, векторы на основе аденовируса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV); векторы, происходящие из вирусов простого герпеса (HSV), включая векторы на основе ампликона, дефектного по репликации HSV и ослабленного HSV (Krisky et al., Gene Ther. 5:1517, 1998).

Другие векторы, которые можно использовать с композициями и способами по настоящему изобретению, включают векторы, происходящие из бакуловирусов и α -вирусов (Jolly, D J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), или плазмидные векторы (такие как векторы на основе Sleeping Beauty или другого транспозона).

Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, подлежащих экспрессии в клетке-хозяине в форме отдельных транскриптов, вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или более) транскриптами, позволяющие бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, используемых в вирусных векторах, включают внутренние участки связывания рибосом (IRES), участки расщепления фурином, вирусный пептид 2A или любую их комбинацию.

Плазмидные векторы, включая плазмидные векторы на основе ДНК, для экспрессии одного или нескольких белков *in vitro* или для прямого введения субъекту, также известны в данной области. Такие векторы могут содержать бактериальную точку начала репликации, вирусную точку начала репликации, гены, кодирующие компоненты, необходимые для репликации плазмиды, и/или один или несколько селективных маркеров, и могут содержать дополнительные последовательности, позволяющие бицистронную или мультицистронную экспрессию.

В рамках изобретения, термин «хозяин» относится к клетке или микроорганизму, нацеленному для генетической модификации с использованием гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты для продукции представляющего интерес полипептида (например, антитела по настоящему изобретению).

Клетка-хозяин может включать любую индивидуальную клетку или культуру клеток, для которой возможно введение вектора или встраивание нуклеиновых кислот, или экспрессия белков. Термин также охватывает потомство клетки-хозяина, независимо от того, одинаковое оно или отличное, генетически или фенотипически. Подходящие

клетки-хозяева могут зависеть от вектора и могут включать клетки млекопитающих, клетки животных, клетки человека, клетки обезьян, клетки насекомых, клетки дрожжей и бактериальные клетки. Эти клетки можно индуцировать для включения вектора или другого материала посредством использования вирусного вектора, трансформации посредством преципитации фосфатом кальция, DEAE-декстрана, электропорации, микроинъекции или других способов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

«Антиген», в рамках изобретения, относится к иммуногенной молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать продукцию антитела, активацию специфических иммунологически компетентных клеток, активацию комплемента, антителозависимую цитотоксичность или любую их комбинацию. Антиген (иммуногенная молекула) может представлять собой, например, пептид, гликопептид, полипептид, гликополипептид, полинуклеотид, полисахарид, липид или т.п. Хорошо понятно, что антиген можно синтезировать, получать рекомбинантным способом или получать из биологического образца. Иллюстративные биологические образцы, которые могут содержать один или несколько антигенов, включают образцы тканей, образцы фекалий, клетки, биологические жидкости или их комбинации. Антигены могут быть продуцированы клетками, которые были подвергнуты модификации или генной инженерии для экспрессии антигена. Антигены могут также присутствовать в или на инфекционном агенте, например, присутствовать в вирионе, или являться экспрессированными или представленными на поверхности клетки, инфицированной инфекционным агентом.

Термин «эпитоп» или «антигенный эпитоп» включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, узнаваемую и специфически связываемую родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, или другая связывающая молекула, домен или белок. Эпитопные детерминанты, как правило, содержат химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, так же как специфические характеристики заряда. Когда антиген представляет собой или содержит пептид или белок, эпитоп может состоять из непрерывных аминокислот (например, линейный эпитоп), или может состоять из аминокислот из различных частей или областей белка, сближенных посредством сворачивания белка (например, не являющийся непрерывным или конформационный эпитоп), или не являющихся непрерывными аминокислот, которые находятся в тесной близости независимо от сворачивания белка.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из одного или нескольких полипептидов, которая специфически связывает антиген посредством по меньшей мере одного участка узнавания эпитопа. Например, термин «антитело» охватывает интактное антитело, содержащее по меньшей мере две тяжелые цепи и две легкие цепи, соединенные дисульфидными связями, так же как любые

антигенсвязывающие часть или фрагмент интактного антитела, имеющие или сохраняющие способность связываться с молекулой антигена-мишени, узнаваемой интактным антителом, такие как фрагмент scFv, Fab или Fab'2. Термин также охватывает полноразмерные антитела или фрагменты антител из любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы (такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgE, IgA и IgD.

Термин «антитело» в настоящем описании использован в самом широком смысле, охватывающем антитела и их фрагменты антител, полученные из любого продуцирующего антитело млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека), или из гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии или трансгенных животных (или посредством других способов получения антител или фрагменты антител). Термин «антитело» не предназначен, чтобы являться ограничивающим, применительно к источнику антитела или способу, которым оно получено (например, посредством гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного, пептидного синтеза и т.д.). Иллюстративные антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела); гуманизированные антитела; полностью человеческие антитела, мышинные антитела; химерные, мышино-человеческие, примато-мышинные, примато-человеческие моноклональные антитела; и антиидиотипические антитела, и могут представлять собой любую интактную молекулу или ее фрагмент. В рамках изобретения, термин «антитело» охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий участок или фрагмент (узнающий эпитоп участок) требуемой специфичности. Термин охватывает подвергнутые генной инженерии и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, диатела, триатела, тетраатела, tandemные ди-scFv, tandemные три-scFv, и т.п., включая их антигенсвязывающие фрагменты.

Термины «VH» и «VL» относятся к переменным связывающим областям из тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, соответственно. VL может представлять собой цепь класса каппа или цепь класса лямбда. Переменные связывающие области содержат дискретные, хорошо определенные подобласти, известные как определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR). CDR расположены внутри гипервариабельной области (HVR) антитела и относятся к последовательностям аминокислот внутри переменных областей антитела, которые, как правило, совместно придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания антителу. Последовательные CDR (т.е., CDR1 и CDR2, и CDR2, и CDR3) отделены друг от друга в первичной структуре посредством каркасной области.

В рамках изобретения, «химерное антитело» представляет собой рекомбинантный белок, содержащий переменные домены и определяющие комплементарность области, происходящие из антитела из не относящихся к человеку видов (например, грызунов), в то время как остальная часть молекулы антитела происходит из антитела человека. В некоторых вариантах осуществления, химерное антитело состоит из антигенсвязывающего фрагмента одного антитела, функционально связанного или иным образом слитого с гетерологичной частью Fc другого антитела. Например, мышино-человеческое химерное антитело может содержать антигенсвязывающий фрагмент мышинового антитела, слитый с частью Fc, происходящей из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный домен Fc может происходить из класса Ig, отличного от исходного антитела, включая IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM.

В рамках изобретения, «гуманизированное антитело» представляет собой молекулу, как правило, полученную с использованием рекомбинантных способов, имеющую антигенсвязывающий участок, происходящий из иммуноглобулина из не относящегося к человеку вида, и остальную иммуноглобулиновую структуру молекулы, основанную на структуре и/или последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело отличается от химерного антитела тем, что, как правило, используют только CDR из не относящегося к человеку вида, привитые в соответствующие каркасные области в человеческом переменном домене. Антигенсвязывающие участки могут относиться к дикому типу или могут являться модифицированными посредством одной или нескольких аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления, гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышиноое антитело, содержащее все шесть CDR из мышинных антител). В других вариантах осуществления, гуманизированные антитела имеют одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые являются измененными, относительно исходного антитела, которые также называют одной или несколькими CDR, «происходящими из» одной или нескольких CDR их исходного антитела.

В рамках изобретения, термин «фрагмент антитела» относится к части, происходящей из полноразмерного антитела или относящейся к полноразмерному антителу, как правило, включающей его антигенсвязывающую или переменную область. Иллюстративные примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

В рамках изобретения, термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту полипептида, содержащему по меньшей мере одну CDR из тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулина, специфически связывающемуся с антигеном, против которого образовано антитело. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR из последовательности VH и VL из антитела.

«Fab» (связывающий антиген фрагмент) представляет собой часть антитела, связывающуюся с антигенами, и включает переменную область и CH1 тяжелой цепи, связанные с легкой цепью посредством межцепевой дисульфидной связи. Каждый фрагмент Fab является одновалентным в отношении связывания антигена, т.е., он имеет один антигенсвязывающий участок. Посредством обработки антитела пепсином получают один большой фрагмент F(ab')₂, приблизительно соответствующий двум связанным дисульфидом фрагментам Fab, имеющий двухвалентную антигенсвязывающую активность и все еще способный к перекрестному связыванию антигена. Как Fab, так и F(ab')₂ являются примерами «антигенсвязывающих фрагментов». Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце домена CH1, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем описании представляет собой обозначение для Fab', в котором остаток(и) цистеина из константных доменов несут свободную тиоловую группу. Фрагменты антител F(ab')₂ часто образуются как пары фрагментов Fab', имеющие шарнирные остатки цистеина между ними. Известны также другие химические соединения фрагментов антител.

Фрагменты Fab можно соединять, например, посредством пептидного линкера, для получения одноцепочечного Fab, также обозначенного в настоящем описании как «scFab». В этих вариантах осуществления, межцепевая дисульфидная связь, присутствующая в нативном Fab, может не присутствовать, и линкер служит, полностью или частично, для связывания или соединения фрагментов Fab в одной полипептидной цепи. Происходящий из тяжелой цепи фрагмент Fab (например, содержащий, состоящий из или в основном состоящий из VH+CH1, или «Fd») и происходящий из легкой цепи фрагмент Fab (например, содержащий, состоящий из или в основном состоящий из VL+CL) можно связывать в любой аранжировке для получения scFab. Например, scFab может быть аранжирован, в направлении от N-конца к C-концу, в соответствии с (фрагмент Fab тяжелой цепи - линкер - фрагмент Fab легкой цепи) или (фрагмент Fab легкой цепи - линкер - фрагмент Fab тяжелой цепи).

«Fv» представляет собой небольшой фрагмент антитела, который содержит полный участок узнавания и связывания антигена. Этот фрагмент в основном состоит из димера домена переменной области одной тяжелой цепи и домена переменной области одной легкой цепи в тесной, нековалентной ассоциации. Однако, даже одиночный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфические для антигена) имеет способность узнавать и связывать антиген, хотя, как правило, с более низкой аффинностью, чем целый связывающий участок.

«Одноцепочечный Fv» также сокращенно обозначенный как «sFv» или «scFv», представляет собой фрагменты антител, содержащие домены VH и VL антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. Полипептид scFv может содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами VH и VL, и связывающий их, который позволяет scFv сохранять или формировать желательную структуру для

связывания антигена, хотя линкер не всегда является необходимым. Такой пептидный линкер можно встраивать в слитый полипептид с использованием стандартных способов, хорошо известных в данной области. Дополнительно или альтернативно, Fv может иметь дисульфидную связь, сформированную между и стабилизирующую VH и VL. Обзор scFv см. в Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). В конкретных вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, содержащий домен VH, домен VL и пептидный линкер, связывающий домен VH с доменом VL. В конкретных вариантах осуществления, scFv содержит домен VH, связанный с доменом VL посредством пептидного линкера, который может находиться в ориентации VH-линкер-VL или в ориентации VL-линкер-VH. Любой scFv по настоящему изобретению можно сконструировать таким образом, чтобы С-конец домена VL был связан посредством короткой пептидной последовательности с N-концом домена VH, или наоборот (т.е., (N)VL(C)-линкер-(N)VH(C) или (N)VH(C)-линкер-(N)VL(C)). Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, линкер может быть связан с N-концевой частью или концом домена VH, домена VL или обоих.

Пептидные линкерные последовательности для использования в scFv или в других слитых белках, таких как нацеленные активирующие комплемент молекулы, описанные в настоящем описании, могут быть выбраны, например, на основании: (1) их способности принимать гибкую протяженную конформацию; (2) их неспособности или отсутствия способности принимать вторичную структуру, которая может взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах и/или на молекуле-мишени; и/или (3) отсутствия или относительного отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могут вступать в реакцию с полипептидами и/или молекулой-мишенью. Другие соображения относительно дизайна линкера (например, длины) могут включать конформацию или диапазон конформаций, в которых VH и VL могут формировать функциональный антигенсвязывающий участок. В конкретных вариантах осуществления, пептидные линкерные последовательности содержат, например, остатки Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, можно также включать в линкерную последовательность. Другие аминокислотные последовательности, которые можно полезным образом использовать в качестве линкера, включают последовательности, описанные в Maratea et al., *Gene* 40:39 46(1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258 8262 (1986); Патенте США No.4935233 и Патенте США No. 4751180. Любой подходящий линкер может быть использован, и как правило, может иметь длину приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 аминокислот, или длину менее чем приблизительно 200 аминокислот, и, предпочтительно, содержит гибкую структуру (может обеспечивать гибкость и пространство между двумя областями, доменами, мотивами, фрагментами или модулями, соединенными посредством линкера), и может,

предпочтительно, являться биологически инертным и/или иметь низкий риск иммуногенности для человека.

Антитела могут являться моноспецифическими (например, связывающимися с одним эпитопом) или мультиспецифическими (например, связывающимися с множеством эпитопов и/или молекул-мишеней). Биспецифические или мультиспецифические антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут, в некоторых вариантах осуществления, содержать один, два или более антигенсвязывающих доменов (например, VH и VL). Могут присутствовать два или более связывающих домена, которые связываются с одинаковыми или различными эпитопами, и биспецифические или мультиспецифические антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в рамках изобретения, могут, в некоторых вариантах осуществления, иметь два или более связывающих домена, которые связываются с различными антигенами или патогенами совместно.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно конструировать в различных форматах. Иллюстративные форматы антител описаны в Spiess et al., *Mol. Immunol.* 67(2):95 (2015), и в Brinkmann and Kontermann, *mAbs* 9(2):182-212 (2017), причем эти форматы и способы их получения приведены в настоящем описании в качестве ссылки и включают, например, привлекающие T-клетки биспецифические активаторы (BiTE), DART, ансамбли выступы-во-впадины (КИН), ансамбли scFv-CH3-КИН, антитела КИН с общей легкой цепью, TandAb, тройные антитела, миниантитела TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, тетравалентные HCab, интра-антитела, CrossMabs, Fab двойного действия (DAF) (два-в-одном или четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, заряженные пары, Fab с обменом плеча, SEEDbodies, Triomab, ансамбли LUZ-Y, Fcab, κλ-антитела, ортогональные Fab, DVD-Ig (например, Патент США No. 8258268, причем полное описание этих форматов приведено в настоящем описании в качестве ссылки), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, КИН IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody и DVI-IgG (четыре-в-одном), так же как так называемое FIT-Ig (например, Публикация РСТ 5 No. WO 2015/103072, причем полное описание этих форматов приведено в настоящем описании в качестве ссылки), так называемые форматы WuxiBody (например, Публикация РСТ No. WO 2019/057122, причем полное описание этих форматов приведено в настоящем описании в качестве ссылки), и так называемые форматы Ig с вставкой в области изгиба (IEI-Ig; например, Публикации РСТ No. WO 2019/024979 и WO 2019/025391, причем полное описание этих форматов приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать два или более доменов VH, два или более доменов VL, или и то, и другое (т.е., два или более доменов VH и два или более доменов VL). В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент имеет формат (в направлении от N-конца к C-концу) VH-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VL, где две последовательности VH могут являться одинаковыми или различными, и две последовательности VL могут являться одинаковыми или различными. Такие связанные scFv могут включать любую комбинацию

доменов VH и VL, аранжированных для связывания с данной мишенью, и в форматах, содержащих две или более VH и/или две или более VL, могут связывать один, два или более различных эпитопов или антигенов. Понятно, что форматы, вмещающие множество антигенсвязывающих доменов, могут включать последовательности VH и/или VL в любой комбинации или ориентации. Например, антигенсвязывающий фрагмент может иметь формат VL-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VH, VH-линкер-VL-линкер-VL-линкер-VH или VL-линкер-VH-линкер-VH-линкер-VL.

В рамках изобретения, определение «моноклональные» указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не предназначено, чтобы являться ограничивающим, применительно к источнику антитела или способу, которым оно получено (например, посредством гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин «моноклональное антитело» охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела (ScFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий фрагмент (узнающий эпитоп участок) требуемой специфичности и имеющую способность связываться с эпитопом. Моноклональные антитела можно получать с использованием любого способа, который обеспечивает продукцию молекул антител посредством стабильных клеточных линий в культуре, такого как способ гибридомы, описанный Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567 от Cabilly). Моноклональные антитела можно также выделять из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991, и Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Такие антитела могут принадлежать к любому классу иммуноглобулина, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, и к любому их подклассу.

Известные полипептиды иммуноглобулинов включают легкие цепи каппа и лямбда, и тяжелые цепи альфа, гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эпсилон и мю, или эквиваленты в других видах. Полноразмерные «легкие цепи» иммуноглобулинов (приблизительно 25 кДа или приблизительно 214 аминокислот) содержат переменную область из приблизительно 110 аминокислот на NH₂-конце и константную область каппа или лямбда на COOH-конце. Полноразмерные «тяжелые цепи» иммуноглобулинов (приблизительно 50 кДа или приблизительно 446 аминокислот), подобным образом, содержат переменную область (из приблизительно 116 аминокислот) и одну из вышеупомянутых константных областей тяжелых цепей, например, гамма (из приблизительно 330 аминокислот).

Основная четырехцепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух

идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM отличается от этого плана тем, что оно состоит из пяти основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J цепь, и таким образом, содержит 10 антигенсвязывающих участков. Секретируемые антитела IgA также отличаются от основной структуры тем, что они могут полимеризоваться с формированием поливалентных ансамблей, содержащих от двух до пяти основных четырехцепочечных единиц вместе с цепью J. Каждая цепь L связана с цепью H посредством одной ковалентной дисульфидной связи, в то время как две цепи H связаны друг с другом посредством одной или нескольких дисульфидных связей, в зависимости от изотипа цепь H. Каждая цепь H и L также имеет внутрицепевые дисульфидные мостики с регулярными промежутками. Спаривание VH и VL вместе формирует один антигенсвязывающий участок.

Каждая цепь H имеет, на N-конце, вариабельный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH1, CH2, CH3), в случае цепей альфа, гамма и дельта, или четыре домена CH (CH1, CH2, CH3, CH4), в случае цепей мю и эpsilon.

Каждая цепь L имеет, на N-конце, вариабельный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом ее конце. Когда цепь L и цепь H спарены, VL выровнен с VH, и CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Цепь L из любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов (CL).

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH), иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), соответственно. Классы γ и α далее разделены на подклассы на основании незначительных различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Структуру и свойства различных классов антител, см., например, в *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds); Appleton and Lange, Norwalk, Conn., 1994, страница 71 и глава 6.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что конкретные отрезки доменов V сильно отличаются по последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако вариабельность не является равномерно распределенной на протяжении 110 аминокислот вариабельных доменов. Вместо этого, области V состоят из относительно инвариантных отрезков, названных каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями необычайной изменчивости, названных «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, преимущественно принимающие конфигурацию бета-листа,

соединенные тремя гипервариабельными областями, формирующими петли, соединяющие структуры β -листа, и в некоторых случаях формирующие их часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и, вместе с гипервариабельными областями из другой цепи, участвуют в формировании антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)). Константные домены не являются непосредственно вовлеченными в связывание антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями.

В рамках изобретения, «эффекторные функции» относятся к тем видам биологической активности, которые можно приписать области Fc антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность, связывание рецептора Fc, фагоцитоз, понижающую регуляцию рецепторов поверхности клетки и активацию В-клеток. Модификации, такие как аминокислотные замены, можно осуществлять в домене Fc, чтобы модифицировать (например, усиливать или уменьшать) одну или несколько функций содержащего Fc полипептида. Такие функции включают, например, связывание рецептора Fc, модуляцию времени полужизни антитела, функцию ADCC, связывание белка А, связывание белка G и связывание комплемента. Аминокислотные модификации, модифицирующие функции Fc, включают, например, мутации T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F, M428L/N434S, E233P/L234V/L235A/G236 Δ /A327G/A330S/P331S, E333A, S239D/A330L/I332E, P257I/Q311, K326W/E333S, S239D/I332E/G236A, N297Q, K322A, S228P, L235E/E318A/K320A/K322A, L234A/L235A и L234A/L235A/P329G. Другие модификации Fc и их эффект на функцию Fc известны в данной области.

В рамках изобретения, термин «гипервариабельная область» относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит несколько «определяющих комплементарность областей» (CDR). Тяжелая цепь содержит три последовательности CDR (CDRH1, CDRH2 и CDRH3), и легкая цепь содержит три последовательности CDR (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Существует разнообразное множество систем для идентификации и нумерации аминокислот, составляющих CDR. Например, гипервариабельная область, как правило, содержит CDR приблизительно около остатков 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи, и приблизительно около 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, при нумерации в соответствии с системой нумерации Kabat, как описано в Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991); и/или приблизительно в остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи, и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, при нумерации в соответствии с системой нумерации Chothia, как описано

в Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и/или приблизительно в остатках 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-117 (L3) в VL, и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-117 (H3) в VH, при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc, J.P., et al., Nucleic Acids Res 27:209-212; Ruiz, M., et al., Nucleic Acids Res 28:219-221 (2000). Эквивалентные положения остатков можно аннотировать и сравнивать для различных молекул с использованием инструмента программного обеспечения Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15:298-300). Соответственно, идентификация CDR иллюстративной последовательности переменного домена (VH или VL), как представлено в настоящем описании, в соответствии с одной схемой нумерации, не исключает антитела, содержащего CDR того же самого переменного домена, как определено с использованием отличной схемы нумерации.

В рамках изобретения, «специфически связывает» относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с антигеном с конкретной аффинностью, в то же время, не ассоциирующемуся или не объединяющемуся значительно с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Аффинность можно определять как равновесную константу связывания (K_a), рассчитанную как отношение k_{on}/k_{off} , в единицах $1/M$, или как равновесную константу диссоциации (K_d), рассчитанную как отношение k_{off}/k_{on} , в единицах M .

В некоторых контекстах, антитело и антигенсвязывающие фрагменты можно описывать, применительно к аффинности и/или к авидности для антигена. Если не указано иное, авидность относится к общей силе связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, и отражает аффинность связывания, валентность антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, то, содержит ли антитело или антигенсвязывающий фрагмент один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более участков связывания), и, например, то, присутствует ли другое средство, которое может влиять на связывание (например, неконкурентный ингибитор антитела или антигенсвязывающего фрагмента).

Каждый вариант осуществления в настоящем описании следует применять, с учетом необходимых изменений, к любому другому варианту осуществления, если явно не указано иное. Предусматривают, что любой вариант осуществления, обсуждаемый в настоящем описании, можно осуществлять, применительно к любому способу, набору, реагенту или композиции по настоящему изобретению, и наоборот. Кроме того, композиции по настоящему изобретению можно использовать для осуществления способов по настоящему изобретению.

II. Обзор

Настоящее изобретение относится к антителам и их связывающим фрагментам антител, которые связываются с MASP-2 человека, активатором лектинового пути системы комплемента. Лектины, такие как MBL, M-фиколин, H-фиколин, L-фиколин, коллектин-10 и коллектин-11, представляют собой специфические узнающие молекулы,

запускающие врожденную систему комплемента. Система комплемента также включает усиливающую петлю терминального пути, которая усиливает инициированную лектином активацию комплемента, приводя к высвобождению еще больших количеств терминальных эффекторных молекул комплемента.

В дополнение к ее важной роли в иммунной защите, система комплемента вносит вклад в повреждение тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует настоятельная необходимость разработки терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих неблагоприятных эффектов. С пониманием того, что является возможным ингибировать лектиновый путь комплемента, в то же время оставляя классический и альтернативный пути интактными, приходит понимание того, что является очень желательным специфически ингибировать только систему активации комплемента, вызывающую конкретную патологию, без полного отключения иммунозащитных способностей комплемента. Например, при состояниях заболевания, при которых активация комплемента опосредована преимущественно лектиновым путем, может предоставлять преимущества специфическое ингибирование только этого пути. Это может оставлять классический путь комплемента интактным для управления процессингом иммунного комплекса и для содействия защите хозяина против инфекции.

Одним из компонентов системы комплемента, который является возможной мишенью в разработке лекарственных средств для специфического ингибирования лектинового пути, является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов зависимой от лектина системы комплемента (таких как MBL, фиколин Н, фиколин М, фиколин L, коллектины, MASP-1, MASP-2, C4 и C2), только MASP-1 и MASP-2 являются как уникальными для лектинового пути, так и необходимым для функционирования системы. Лектины (такие как MBL, Н фиколин, М фиколин, L фиколин, коллектин-10, и коллектин-11) также являются уникальными компонентами в лектиновом пути. Однако, потеря любого одного из лектиновых компонентов необязательно ингибирует активацию системы из-за избыточности лектинов. Было бы необходимым ингибировать все лектины для гарантированного ингибирования зависимой от лектина системы активации комплемента. Кроме того, поскольку известно также, что MBL и фиколины имеют независимую от комплемента опсоническую активность, ингибирование функции лектинового пути может привести к потере этого обеспечивающего преимущества механизма защиты хозяина против инфекции. В отличие от этого, независимая от комплемента опсоническая активность остается интактной, когда MASP-2 является мишенью для ингибирования. Дополнительным преимуществом MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования лектинового пути является то, что концентрация MASP-2 в плазме является одной из самых низких для любых белков комплемента (≈ 500 нг/мл); таким образом, соответственно, низкие концентрации высокоафинных ингибиторов MASP-2 могут являться достаточными для получения полного ингибирования (Moller Kristensen, M., et al., J. Immunol Methods 282:159 167,

2003). Это заметно отличается от MASP-1, который имеет концентрацию в плазме ~ 10000 нг/мл, и таким образом, ожидают, что существенно более высокие концентрации высокоафинных ингибиторов MASP-1 могут являться необходимыми для получения полного ингибирования.

III. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с MASP-2. В некоторых вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют лектиновый путь активации комплемента. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, могут представлять собой человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела или мышьи антитела, или антигенсвязывающий фрагмент любого из вышеуказанных. Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой одноцепочечные антитела, ScFv, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂, одновалентные антитела, лишенные шарнирной области, или полноразмерные антитела. Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут являться одновалентными, двухвалентными или мультивалентными.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, содержат константную область иммуноглобулина. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой иммуноглобулины IgG или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, иммуноглобулин IgG представляет собой иммуноглобулин IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, специфически связываются с эпитопом, локализованным внутри домена сериновой протеазы MASP-2 человека. В некоторых вариантах осуществления, эпитоп расположен в пределах аминокислот ₄₉₆DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO:6) MASP-2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты конкурируют с C4 за связывание с MASP-2.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с MASP-2, содержащему: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1 с последовательностью NXXMH, где X в положении 2 представляет собой H или Y, и где X в положении 3 представляет собой H или W; HC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:63 (DIDXSDSEXXYXXKFKD), где X в положении 4 представляет собой P или A; и где X в положении 9 представляет собой T или I, и где X в положении 10 представляет собой H или Y, и где X в положении 12 представляет собой I или N; и где X в положении 13 представляет собой E или Q; и HC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:18

(GDITTTLRVFDV); и (b) переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:64 (SASSSVXYMY), где X в положении 7 представляет собой R или S; LC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT). В одном варианте осуществления, HC-CDR1 переменной области тяжелой цепи, в соответствии с (а), содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH).

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 14 (NYWMH). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 56 (NYHMH). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 57 (NHHMH).

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:53 (DID~~A~~SDSETHYIEKFKD).

В некоторых вариантах осуществления, LC-CDR1 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY). В некоторых вариантах осуществления, LC-CDR1 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY).

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:56 или SEQ ID NO:57, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO:53, HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14; HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:53, и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56; HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:53, и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57; HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:53, и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRVFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID~~A~~SDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRVFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34

(DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID_ASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57 (NHHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID_ASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT). В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14; HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22, и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления, HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:25, HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:27, и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:29, и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:41, LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:43, и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:45.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:47. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:47. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:47. В следующих вариантах осуществления,

вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:47. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:11. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:11.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:9. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:12. В следующих вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:9, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:12.

В конкретных вариантах осуществления, антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит ноль, одну, две или три аминокислотных замены в каждой из шести CDR, где одна или несколько из этих замен, необязательно, представляет собой консервативную замену и/или представляет собой замену до кодированной в зародышевой линии аминокислоты.

Обобщение последовательностей вариабельных областей и CDR для конкретных антител против MASP-2, описанных в настоящем описании, представлено в ТАБЛИЦАХ 1A, 1B и 1C, ниже. («SIN» обозначает SEQ ID NO.)

ТАБЛИЦА 1A: Обобщение последовательностей антител против MASP-2

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи (ак)	Вариабельная область легкой цепи (ак)	Вариабельная область тяжелой цепи (ДНК)	Вариабельная область легкой цепи (ДНК)
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	SIN: 69	SIN: 72
OMS852	SIN: 46	SIN: 47	SIN: 75	SIN: 76
OMS854	SIN: 48	SIN: 47	SIN: 77	SIN: 76
OMS856	SIN: 49	SIN: 47	SIN: 78	SIN: 76

OMS858	SIN: 50	SIN: 47	SIN: 79	SIN: 76
OMS860	SIN: 8	SIN: 11	SIN: 70	SIN: 73
OMS870	SIN: 9	SIN: 12	SIN: 71	SIN: 74

ТАБЛИЦА 1В: Обобщение последовательностей высокоаффинных ингибирующих антител против MASP-2 с CDR

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи (ак)	Вариабельная область легкой цепи (ак)	Тяжелая цепь, CDR1; CDR2; CDR3	Легкая цепь, CDR1; CDR2; CDR3
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS860	SIN: 8	SIN: 11	14, 22, 18	39, 34, 36
OMS870	SIN 9	SIN 12	25, 27, 29	41, 43, 45

ТАБЛИЦА 1С: Обобщение антитела MASP-2 OMS850 с гуманизированными и модифицированными вариантами

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи (ак)	Вариабельная область легкой цепи (ак)	Тяжелая цепь, CDR1; CDR2; CDR3	Легкая цепь, CDR1; CDR2; CDR3
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS852	SIN: 46	SIN: 47	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS854	SIN: 48	SIN: 47	14, 53, 18	32, 34, 36
OMS856	SIN: 49	SIN: 47	56, 53, 18	32, 34, 36
OMS858	SIN: 50	SIN: 47	57, 53, 18	32, 34, 36

В конкретных вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, содержат одну или несколько мутаций в области Fc. Например, область Fc может содержать одну или несколько мутаций, улучшающих стабильность или эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления, область Fc содержит аминокислотную замену S228P. В некоторых вариантах осуществления, область Fc содержит одну или несколько мутаций, способствующих взаимодействиям с FcRn при низком pH.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, связываются с доменом сериновой протеазы MASP-2 человека с аффинностью менее чем 0,2 нМ, менее чем 0,3 нМ, менее чем 0,4 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,6 нМ, менее чем 0,7 нМ, менее чем 0,8 нМ, менее чем 0,9 нМ, менее чем 1,0 нМ, менее чем 1,2 нМ, менее чем 1,4 нМ, менее чем 1,6 нМ, менее чем 1,8 нМ, менее чем 2,0 нМ, менее чем 2,5 нМ, менее чем 3,0 нМ, менее чем 3,5 нМ, менее чем 4,0 нМ, менее чем 4,5 нМ, менее чем 5,0 нМ, менее чем 5,5 нМ, менее

чем 6,0 нМ, менее чем 6,5 нМ, менее чем 7,0 нМ, менее чем 7,5 нМ, менее чем 8,0 нМ, менее чем 8,5 нМ, менее чем 9,0 нМ, менее чем 9,5 нМ, менее чем 10,0 нМ, менее чем 12 нМ, менее чем 14 нМ, менее чем 16 нМ, менее чем 18 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем 22 нМ, менее чем 24 нМ, менее чем 26 нМ, менее чем 28 нМ или менее чем 30 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, ингибируют лектиновый путь активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты ингибируют лектиновый путь в крови млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления компонентов комплемента на клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления, ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления C3b, накопления C4 или накопления MAC. В некоторых вариантах осуществления, ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления компонентов комплемента в условиях анализа, специфических для лектинового пути. В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, ингибируют лектиновый путь активации комплемента в крови млекопитающего, но не ингибируют классический путь активации комплемента в крови млекопитающего.

IV. Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим любые из описанных в настоящее время антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или их часть (например, CDR, VH, VL, тяжелую цепь или легкую цепь). В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид является оптимизированным по кодонному составу для экспрессии в клетке-хозяине. После того, как кодирующая последовательность станет известной или идентифицированной, оптимизацию кодонного состава можно осуществлять с использованием известных способов и инструментов, таких как инструмент GenScript® OptimumGene™ или ThermoFisher Scientific® GeneArt GeneOptimizer™. Оптимизированные по кодонному составу последовательности включают последовательности, являющиеся частично оптимизированными по кодонному составу, имеющие один или несколько кодонов, оптимизированных для экспрессии в клетке-хозяине, и те, которые являются полностью оптимизированными по кодонному составу. Следует также понимать, что полинуклеотиды, кодирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, могут иметь различные нуклеотидные последовательности, в то же время, все еще кодирующие одинаковый белок, из-за вырожденности генетического кода, сплайсинга и т.д.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с любой одной или несколькими из SEQ ID NO:69-79.

В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может содержаться в полинуклеотиде, включающем другие последовательности и/или признаки. Например, полинуклеотид может включать одну или несколько последовательностей, которые можно использовать для контроля или экспрессии кодируемых белков, такие как промоторная последовательность(и), последовательность(и) для полиаденилирования, последовательность(и), кодирующие сигнальные пептиды, и т.д. Полинуклеотид может содержать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим или вмещающим полинуклеотид, кодирующий любые из описанных в настоящее время антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Можно использовать любой подходящий вектор, включая вирусные векторы и плазмидные векторы. В конкретных вариантах осуществления, вектор содержит полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, так и легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, которые совместно составляют полное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент и легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, могут содержаться в одной открытой рамке считывания, в этом случае, они могут, необязательно, быть разделены полинуклеотидом, кодирующим участок расщепления протеазы, и/или полинуклеотидом, кодирующим саморасщепляющийся пептид. Альтернативно, последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент и легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, могут содержаться в отдельных открытых рамках считывания в одном векторе. В других вариантах осуществления, последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент и легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, присутствуют на двух различных векторах, так что первый вектор кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, и второй вектор кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент.

В следующем аспекте, настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид или вектор, описанный в настоящем описании. Можно использовать любую подходящую клетку, в которую можно вводить такой полинуклеотид или вектор. Примеры таких клеток включают эукариотические клетки, включая клетки дрожжей, клетки животных, клетки насекомых, клетки млекопитающих и клетки растений; и прокариотические клетки, включая бактериальные клетки, такие как *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин представляет собой иммортализованную линию клеток млекопитающего. Клетки, подходящие для

использования в продукции и экспрессии полинуклеотидов и векторов, известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления, клетку можно трансфицировать полинуклеотидом или вектором, описанным в настоящем описании. Термин «трансфекция» охватывает любой способ, известный специалисту в данной области для введения молекул нуклеиновых кислот в клетки. Такие способы включают, например, электропорацию, липофекцию, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вируса и т.д. Клетки-хозяева можно трансфицировать стабильно или временно.

В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин экспрессирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодированные полинуклеотидом или вектором. Такая экспрессия может включать посттрансляционные модификации, такие как удаление сигнальной последовательности, гликозилирование и другие такие модификации. В родственном аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения представленных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, причем способы включают культивирование клетки-хозяина в течение достаточного времени в условиях, позволяющих экспрессию антител или их антигенсвязывающих фрагментов, и выделение антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Способы, которые можно использовать для выделения и очистки полученных рекомбинантным способом белков, включают, например, получение супернатанта из подходящих клеток-хозяев, которые секретируют белки в культуральную среду, концентрирование среды и очистку белка посредством пропускания концентрата через подходящий матрикс или серии матриксов для очистки. Способы очистки белков хорошо известны в данной области.

V. Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к композициям, которые содержат лекарственное средство, выбранное из любого одного или нескольких из описанных в настоящее время антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток-хозяев, отдельно или в любой комбинации, и могут также включать другие выбранные лекарственные средства. Такие композиции могут дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или разбавителей.

Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным, биосовместимым, и выбранным таким образом, чтобы не оказывать неблагоприятное влияние на биологическую активность лекарственного средства (и любых других лекарственных средств в комбинации с ним). Примеры фармацевтически приемлемых носителей для пептидов описаны в Патенте США No. 5211657 от Yamada. Лекарственные средства, описанные в настоящем описании, можно формулировать в препараты в твердой, полутвердой, гелеобразной, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депозитарии, средства для ингаляций и инъекций, позволяющие пероральное, парентеральное или хирургическое введение.

Предусмотрено также местное введение композиций посредством покрытия медицинских инструментов и т.п.

Пригодные носители для парентеральной доставки посредством инъекции, инфузии или орошения и местной доставки, включают дистиллированную воду, забуференный фосфатом физиологический раствор, нормальные или лактированные растворы Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнка или пропандиол. Кроме того, стерильные, нелетучие масла можно использовать в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое биосовместимое масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в получении средств для инъекций. Носитель и средство можно объединять в форме жидкости, суспензии, способного или не способного к полимеризации геля, пасты или бальзама.

Носитель может также содержать средство для доставки для замедления (т.е., продления, задержки или регуляции) доставки средств(а), или для улучшения доставки, поглощения, стабильности или фармакокинетики лекарственных средств(а). Такое средство для доставки может включать, в качестве неограничивающего примера, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие системы доставки на основе гидрогелей и мицелл включают сополимеры PEO:РНВ:PEO и сополимерные/циклодекстриновые комплексы, описанные в WO 2004/009664 A2, и PEO и PEO/циклодекстриновые комплексы, описанные в Публикации патентной заявки США No. 2002/0019369 A1. Такие гидрогели можно инъектировать местно в участке намеченного воздействия, или подкожно или внутримышечно для формирования депо для замедленного высвобождения.

Композиции по настоящему изобретению можно формулировать для доставки посредством любого подходящего способа, включая, без ограничения, перорально, местно, чрескожно, подъязычно, буккально, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально или в форме средства для ингаляции.

Композиции по настоящему изобретению могут также включать биосовместимые наполнители, такие как диспергирующие или увлажняющие средства, суспендирующие средства, разбавители, буферы, усиливающие проникновение средства, эмульгаторы, связующие вещества, загустители, вкусоароматические средства (для перорального введения).

Фармацевтические композиции, в соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения, формулируют таким образом, чтобы позволять активным ингредиентам, содержащимся в них, являться биодоступными после введения композиции пациенту. Композиции, которые вводят субъекту, могут принимать форму одной или нескольких единиц дозирования, и контейнер для описанного в настоящем описании лекарственного средства может содержать множество единиц дозирования.

Фактические способы получения таких лекарственных форм известны или очевидны специалисту в данной области; например, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Композиция, предназначенная для введения, в любом случае, содержит эффективное количество лекарственного средства или композиции по настоящему изобретению, для лечения представляющего интерес заболевания или состояния, в соответствии с объяснениями в настоящем описании.

Композиция может находиться в форме твердого вещества или жидкости. В некоторых вариантах осуществления, носитель(и) находятся в форме частиц, так что композиции находятся, например, в форме таблетки или порошка. Носитель(и) могут являться жидкими, причем композиции представляют собой, например, пероральное масло, пригодную для инъекции жидкость или аэрозоль, который можно использовать, например, для введения посредством ингаляции. Когда она предназначена для перорального введения, фармацевтическая композиция, предпочтительно, находится либо в твердой, либо в жидкой форме, где полутвердые, полужидкие, суспензионные и гелеобразные формы включены в формы, рассматриваемые в настоящем описании либо как твердые, либо как жидкие.

В качестве твердой композиции для перорального введения, фармацевтическую композицию можно составлять в порошок, гранулу, пересованную таблетку, пилюлю, капсулу, жевательную резинку, облатку или т.п. Такая композиция, как правило, содержит один или несколько инертных наполнителей или разбавителей, таких как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза. Кроме того, может присутствовать одно или несколько из следующего: связующих веществ, таких как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнителей, таких как крахмал, лактоза или декстрины, дезинтегрирующих средств, таких как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и т.п.; смазывающих средств, таких как стеарат магния или Sterotex; средств, способствующих скольжению, таких как коллоидный диоксид кремния; подсластителей, таких как сахароза или сахарин; вкусоароматического средства, такого как ароматизатор перечной мяты, метилсалицилат или ароматизатор апельсина; и окрашивающего средства. Когда композиция находится в форме капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать, в дополнение к материалам вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Композиция может находиться в форме жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки посредством инъекции, в качестве двух примеров. Когда они предназначены для перорального введения, предпочтительные композиции содержат, в дополнение к представленным соединениям, одно или несколько из подсластителя, консерванта, красителя/окрашивающего средства и усилителя вкуса. В композицию, предназначенную для введения посредством инъекции, можно включать

одно или несколько из поверхностно-активного средства, консерванта, увлажняющего средства, диспергирующего средства, суспендирующего средства, буфера, стабилизатора и изотонического средства.

Жидкие фармацевтические композиции, независимо от того, представляют ли они собой растворы, суспензии или другую подобную форму, могут включать один или несколько из следующих наполнителей: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно, физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множественных доз, изготовленные из стекла или пластика. Физиологический солевой раствор является предпочтительным наполнителем. Пригодная для инъекций фармацевтическая композиция является предпочтительно стерильной.

Жидкая композиция, предназначенная либо для парентерального, либо для перорального введения, должна содержать такое количество лекарственного средства, как описано в настоящем описании, чтобы можно было получать подходящую дозировку. Термин «парентеральный» включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, интратермальную или внутриартериальную инъекцию или инфузию. Как правило, лекарственное средство составляет по меньшей мере 0,01% композиции. Когда оно предназначено для перорального введения, это количество можно менять, чтобы оно составляло между приблизительно 0,1% и приблизительно 70% от массы композиции. Конкретные пероральные фармацевтические композиции содержат между приблизительно 4% и приблизительно 75% лекарственного средства.

Композиция может быть предназначена для местного введения, в этом случае носитель может подходящим образом содержать основу в форме раствора, эмульсии, мази или геля. Основа, например, может содержать одно или несколько из следующего: вазелина, ланолина, полиэтиленгликолей, пчелиного воска, минерального масла, разбавителей, таких как вода и спирт, и эмульгаторов и стабилизаторов. Загустители могут присутствовать в композиции для местного введения. Если она предназначена для чрескожного введения, композиция может включать чрескожный пластырь или устройство для ионтофореза. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который может плавиться в прямой кишке и высвободить лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистую основу в качестве пригодного нераздражающего

наполнителя. Такие основы включают, без ограничения, ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

Композиция может включать различные материалы, модифицирующие физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования. Например, композиция может включать материалы, формирующие покрывающую оболочку вокруг активных ингредиентов. Материалы, формирующие покрывающую оболочку, являются, как правило, инертными, и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других средств для кишечнорастворимого покрытия. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Композиция в твердой или жидкой форме может включать средство, которое связывается с лекарственным средством(ами) по настоящему изобретению и таким образом, способствует доставке соединения. Подходящие средства, которые могут действовать в таком качестве, включают один или несколько белков или липосому.

Композиция может в основном состоять из единиц дозирования, которые можно вводить в форме аэрозоля. Термин аэрозоль использован для обозначения разнообразного множества систем, лежащих в диапазоне от систем коллоидного характера до систем, состоящих из находящихся под давлением баллонов. Доставку можно осуществлять посредством сжиженного или сжатого газа, или посредством подходящей насосной системы, распределяющей активные ингредиенты. Аэрозоли можно доставлять в однофазной, двухфазной или трехфазной системе для доставки активного ингредиента(ов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, субконтейнеры, и т.п., которые совместно могут формировать набор. Специалист в данной области, без излишнего экспериментирования, может определять предпочтительные аэрозоли.

Понятно, что композиции по настоящему изобретению также охватывают молекулы носителя для полинуклеотидов, как описано в настоящем описании (например, липидные наночастицы, платформы для доставки в наномасштабе и т.п.).

Фармацевтические композиции можно получать посредством способов, хорошо известных в области фармацевтики. Например, композицию, предназначенную для введения посредством инъекции, можно получать посредством объединения композиции, содержащей лекарственное средство, как описано в настоящем описании, и необязательно, одного или нескольких из солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой, таким образом, чтобы получать раствор. Можно добавлять поверхностно-активное вещество для облегчения получения гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с композицией таким образом, чтобы облегчать растворение или гомогенное суспендирование в водной системе для доставки.

VI. Способы и применения

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам применения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции по настоящему изобретению в активации лектинового пути комплемента у субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту-млекопитающему количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции по настоящему изобретению, достаточного для лектинового пути активации комплемента у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, способ может дополнительно включать, до введения соединения по настоящему изобретению субъекту, определение того, что субъект поражен связанным с лектиновым путем заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления, субъект-млекопитающее представляет собой человека.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, нуклеиновой кислоте, вектору, клетке или композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения связанного с лектиновым путем заболевания или нарушения. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, нуклеиновой кислоте, вектору, клетке или композиции по настоящему изобретению для применения в способе изготовления или получения лекарственного средства для лечения связанного с лектиновым путем заболевания или нарушения.

Как описано в Патенте США No. 7919094; Патенте США No. 8840893; Патенте США No. 8652477; Патенте США No. 8951522, Патенте США No. 9011860, Патенте США No. 9475885, Патенте США No. 9644035, Публикациях патентных заявок США No. US2013/0344073, US2013/0266560, US 2015/0166675, US2017/0137537, US2017/0166660, US2017/0189525, US2017/0267781, US2017/0283508, US2017/0253667, US2018/0105604, WO2018/045054, WO2018/071701, WO2019/036460, WO2019/246367, WO2021/178902 и одновременно находящейся на рассмотрении Патентной заявки США серийный No 17/103672 (каждый из которых передан Omeros Corporation, правопреемнику настоящей заявки, и содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки), зависимость от MASP-2 активацию комплемента рассматривали как вносящую вклад в патогенез многочисленных острых и хронических состояний заболевания. Например, как описано в Патенте США No. 8951522, первичной функцией системы комплемента, части врожденной иммунной системы, является защита хозяина против инфекционных агентов, однако, неадекватная или избыточная активация системы комплемента может приводить к серьезному заболеванию, такому как тромботические микроангиопатии (ТМА, включая aHUS, TTP и HUS), при которых повреждение эндотелия, так же как накопление фибрина и богатые тромбоцитами тромбы в микрососудистой сети, приводят к повреждению органов. Лектиновый путь играет доминирующую роль в активации комплемента в условиях стресса или повреждения эндотелиальных клеток, и предотвращение активации MASP-2 и лектинового пути прекращает последовательность ферментативных реакций,

приводящих к формированию мембраноатакующего комплекса, активации тромбоцитов и привлечению лейкоцитов. Как описано в Патенте США No. 8652477, в дополнение к инициации лектинового пути, MASP-2 может также активировать систему свертывания крови и является способной к расщеплению протромбина до тромбина.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из тромботической микроангиопатии (ТМА), почечного нарушения, воспалительной реакции, возникающей в результате трансплантации ткани или органа, ишемически-реперфузионного повреждения, осложнения, ассоциированного с диабетом, осложнения, ассоциированного с гемодиализом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-кишечного нарушения, легочного нарушения, офтальмологического заболевания или нарушения, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, реакции трансплантат против хозяина, веноокклюзионного заболевания и диффузного альвеолярного кровоизлияния.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинированной терапии, включающей одно или несколько из антитела или антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции по настоящему изобретению, и одно или несколько дополнительных лекарственных средств. Понятно, что в такой комбинированной терапии, одно или несколько из антитела или антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции по настоящему изобретению, и одно или несколько дополнительных лекарственных средств можно вводить в любом порядке и в любой последовательности, с любым временным интервалом или в одно и то же время.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой тромботическую микроангиопатию (ТМА), включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), невосприимчивую ТТП, синдром Апшо-Шульмана (USS), гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), независимый от фактора H атипичный гемолитический синдром, aHUS, вторичный по отношению к инфекции, устойчивый к плазмотерапии aHUS, ТМА, вторичную по отношению к злокачественной опухоли, ТМА, вторичную по отношению к химиотерапии или другой противораковой терапии, ТМА, вторичную по отношению к трансплантации, или ТМА, ассоциированную с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток, ТМА, вторичную по отношению к инфекции, и IgA-вакулит.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой реакцию трансплантат против хозяина (GVHD), включая острую GVHD, хроническую GVHD или устойчивую к стероидам GVHD. В некоторых вариантах осуществления, субъекта, страдающего от или подверженного риску развития GVHD, ранее подвергали, подвергают или планируют подвергать трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой диффузное альвеолярное кровоизлияние (DAH). В некоторых вариантах осуществления, субъекта, страдающего от или подверженного риску развития DAH, ранее подвергали, подвергают или планируют подвергать трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой синдром подтекания капилляров, синдром приживления, перегрузку жидкостью, или синдром идиопатической пневмонии. В некоторых вариантах осуществления, субъекта, страдающего от или подверженного риску развития одного или нескольких из этих заболеваний или нарушений, ранее подвергали, подвергают или планируют подвергать трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой веноокклюзионное заболевание (VOD). В некоторых вариантах осуществления, субъекта, страдающего от или подверженного риску развития VOD, ранее подвергали, подвергают или планируют подвергать трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой неврологический симптом, ассоциированный с реакцией трансплантат против хозяина или ТМА, такой как астения, парестезии, тетраплегия, сенсомоторная недостаточность, дизавтономная полиневропатия или нейрогенный мочевой пузырь.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой почечное нарушение, включая, но без ограничения, мезангиопролиферативный гломерулонефрит, мембранозный гломерулонефрит, мембранопротеративный гломерулонефрит (мезангиокапиллярный гломерулонефрит), острый постинфекционный гломерулонефрит (постстрептококковый гломерулонефрит), С3-гломерулопатию, криоглобулинемический гломерулонефрит, слабоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит, волчаночный нефрит, нефрит при пурпуре Геноха-Шенлейна и IgA-нефропатию.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой почечный фиброз (например, тубулоинтерстициальный фиброз) и/или протеинурию у субъекта, страдающего от или подверженного риску развития хронической почечной недостаточности, хроническую почечную недостаточность, склеродермию почки (включая склеродермический почечный криз), гломерулярное заболевание (например, фокальный сегментарный гломерулосклероз), нарушение иммунных комплексов (например, IgA-нефропатию, мембранозную нефропатию), волчаночный нефрит, нефротический синдром, диабетическую нефропатию, тубулоинтерстициальное поражение и гломерулонефрит (например, С3-гломерулопатию), или заболевание или состояние, ассоциированное с

протеинурией, включая, но без ограничения, нефротический синдром, преэклампсию, эклампсию, токсические повреждения почек, амилоидоз, сосудистые коллагенозы (например, системную красную волчанку), дегидратацию, гломерулярные заболевания (например, мембранозный гломерулонефрит, мембранозную гломерулярную нефропатию, фокальный сегментарный гломерулонефрит, С3-гломерулопатию, болезнь минимальных изменений, липоидный нефроз), чрезмерные физические нагрузки, стресс, доброкачественную ортостатическую (постуральную) протеинурию, фокальный сегментарный гломерулосклероз, IgA-нефропатию (т.е., болезнь Бергера), IgM-нефропатию, мембранопролиферативный гломерулонефрит, мембранозную нефропатию, болезнь минимальных изменений, саркоидоз, синдром Альпорта, сахарный диабет (диабетическую нефропатию), токсичность, индуцированную лекарственными средствами (например, NSAIDS, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами, ингибиторами АСЕ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином), или другими нефротоксинами); болезнь Фабри, инфекции (например, HIV, сифилис, гепатит А, В или С, постстрептококковую инфекцию, мочеполовой шистозоматоз); аминокацидурию, синдром Фанкони, гипертонический нефросклероз, интерстициальный нефрит, серповидноклеточную анемию, гемоглобинурию, множественную миелому, миоглобинурию, отторжение органа (например, отторжение трансплантата почки), геморрагическую лихорадку Эбола, синдром ногтей-надколенника, семейную средиземноморскую лихорадку, синдром HELLP, системную красную волчанку, гранулематоз Вегенера, ревматоидный артрит, болезнь накопления гликогена типа 1, синдром Гудпасчера, пурпуру Геноха-Шенлейна, инфекцию мочевыводящих путей, распространившуюся на почки, синдром Шегрена и постинфекционный гломерулонефрит.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой воспалительную реакцию, возникшую в результате трансплантации ткани или солидного органа, включая, но без ограничения, аллотрансплантацию или ксенотрансплантацию целых органов (например, почки, сердца, печени, поджелудочной железы, легкого, роговицы и т.п.) или трансплантацию тканей (например, клапанов, сухожилий, костного мозга и т.п.). В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой отсроченную функцию трансплантата.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой ишемически-реперфузионное повреждение (I/R), включая, но без ограничения, миокардиальное I/R, желудочно-кишечное I/R, почечное I/R и I/R после репарации аневризмы аорты, I/R, ассоциированное с сердечно-легочным шунтированием, церебральное I/R, инсульт, васкулярный реанастомоз в связи с трансплантацией органов или повторным присоединением отделенных или травмированных конечностей или пальцев, реваскуляризацию трансплантатов и/или

реплантатов, и гемодинамическую реанимацию после шока и/или хирургических процедур.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой осложнение, ассоциированное с диабетом без ожирения (диабетом типа-1 или инсулин-зависимым сахарным диабетом), и/или осложнения, ассоциированные с диабетом типа-1 или типа-2 (с началом во взрослом возрасте), включая, но без ограничения, диабетическую ангиопатию, диабетическую невропатию, диабетическую ретинопатию или диабетический отек желтого пятна.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, включая, но без ограничения, нефрит при пурпуре Геноха-Шенлейна, ассоциированный с системной красной волчанкой васкулит, ассоциированный с ревматоидным артритом васкулит (также называемый злокачественный ревматоидный артрит), васкулит иммунных комплексов, ассоциированный с аутоантителами против цитоплазмы нейтрофилов (ANCA) васкулит, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь (артериит) Kawasaki, венозную газовую эмболию (VGE) и ингибирование рестеноза после стентирования, ротационную атерэктомия и/или чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (PTCA).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой воспалительное желудочно-кишечное нарушение, включая, но без ограничения, панкреатит, дивертикулит и нарушения кишечника, включая болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженной кишки и воспалительное заболевание кишечника (IBD). В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение вызывается или обостряется посредством фиброза пищеварительного тракта. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой фиброз поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой легочное нарушение, включая, но без ограничения, острый респираторный дистресс-синдром, связанное с трансфузией острое повреждение легких, ишемическое/реперфузионное острое повреждение легких, хроническое обструктивное заболевание легких, астму, гранулематоз Вегенера, гломерулонефрит с образованием антител против базальной мембраны (болезнь Гудпасчера), синдром мекониевой аспирации, аспирационную пневмонию, облитерирующий бронхиолитический синдром, идиопатический пульмонарный фиброз, острое повреждение легких, вторичное по отношению к ожогу, некардиогенный отек легких, связанное с трансфузией угнетение дыхания и эмфизема.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой запускаемую экстракорпоральным воздействием воспалительную реакцию, и способ включает лечение субъекта, подвергающегося

процедуре экстракорпоральной циркуляции, включая, но без ограничения, гемодиализ, плазмаферез, лейкоферез, экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЕСМО), индуцированную гепарином преципитацию LDL (HELP) при экстракорпоральной мембранной оксигенации и сердечно-легочное шунтирование (CPB).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из воспалительного или невоспалительного артрита и других скелетно-мышечных нарушений, включая, но без ограничения, остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, подагру, невропатическую артропатию, псориазический артрит, анкилозирующий спондилит или другие спондилоартропатии и кристаллические артропатии, мышечную дистрофию и системную красную волчанку (SLE).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой кожное нарушение, включая, но без ограничения, псориаз, аутоиммунные буллезные дерматозы, эозинофильный спонгиоз, буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз, атопический дерматит, гестационный герпес и другие кожные нарушения, и лечение термических и химических ожогов, включая вызванное этим подтекание капилляров.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой нарушение или повреждение периферической нервной системы (ПНС) и/или центральной нервной системы (ЦНС), включая, но без ограничения, рассеянный склероз (MS), миастению гравис (MG), болезнь Гентингтона (HD), боковой амиотрофический склероз (ALS), синдром Гийена-Барре, реперфузию после инсульта, дегенеративное заболевание межпозвоночных дисков, церебральную травму, болезнь Паркинсона (PD), болезнь Альцгеймера (AD), синдром Миллера-Фишера, внутримозговую травму и/или кровоизлияние, травматическое повреждение головного мозга, фиброз ЦНС, демиелинизацию и менингит.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой сепсис или состояние, возникающее в результате сепсиса, включая, без ограничения, тяжелый сепсис, септический шок, острый респираторный дистресс-синдром, возникающий в результате сепсиса, гемолитическую анемию, синдром системного воспалительного ответа или геморрагический шок.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой нарушение мочеполовых путей, включая, но без ограничения, синдром болезненного мочевого пузыря, синдром чувствительного мочевого пузыря, хронический небактериальный цистит и интерстициальный цистит, мужское и женское бесплодие, плацентарную дисфункцию и невынашивание, и преэклампсию.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой воспалительную реакцию у субъекта, подвергаемого лечению с использованием химиотерапевтических средств и/или радиотерапии, включая, без ограничения, лечение злокачественных состояний.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой зависимую от ангиогенеза злокачественную опухоль, включая, но без ограничения, солидную опухоль(и), опухоль(и) гемопозитического происхождения, карциноидные опухоли высокого риска и метастазы опухолей. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой зависимую от ангиогенеза доброкачественную опухоль, включая, но без ограничения, гемангиомы, невриномы слухового нерва, нейрофибромы, трахомы, карциноидные опухоли и пиогенные гранулемы.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой эндокринное нарушение, включая, но без ограничения, тиреоидит Хашимото, стресс, тревожность и другие потенциальные гормональные нарушения, включающие регулируемое высвобождение пролактина, фактора роста или инсулиноподобного фактора роста и адренокортикотропина, из гипофиза.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой офтальмологическое заболевание или нарушение, включая, но без ограничения, связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна, глаукому и эндофтальмит. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой офтальмологическое ангиогенное заболевание или состояние, включая, но без ограничения, связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна, увеит, меланому глаза, неоваскуляризацию роговицы, первичный птеригий, индуцированный HSV стромальный кератит, индуцированный HSV-1 лимфангиогенез роговицы, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический отек желтого пятна, ретинопатию недоношенных, окклюзию вены сетчатки, отторжение трансплантата роговицы, неоваскулярную глаукому, кровоизлияние в стекловидное тело, вторичное по отношению к пролиферативной диабетической ретинопатии, оптиконевромиелит, переднюю субкапсулярную катаракту, помутнение задней капсулы и покраснение радужки.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой диссеминированное внутрисосудистое свертывание (DIC) или другое опосредованное комплементом нарушение свертывания, включая DIC, вторичное по отношению к сепсису, тяжелой травме, включая неврологическую травму (например, острую травму головы, см. Kumura et al, *Acta Neurochirurgica* 55:23-28 (1987)), инфекции (бактериальной, вирусной, грибковой, паразитарной), злокачественной опухоли, акушерским осложнениям, заболеванию печени, тяжелым токсическим реакциям (например, реакции на укус змеи, укус насекомого, трансфузию), шоку, тепловому удару, отторжению трансплантата, аневризме сосудов, печеночной недостаточности, лечению злокачественной опухоли посредством химиотерапии или радиотерапии, ожогу или случайному радиоактивному облучению.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из острого лучевого синдрома, болезни плотных депозитов, болезни Дегоса, катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS), болезни Бехчета, криоглобулинемии; пароксизмальной ночной гемоглобинурии («PNH») и болезни холодových агглютининов.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из aHUS, HSCT-TMA, IgAN и волчаночного нефрита (LN).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение ассоциировано с индуцируемой фибрином активацией системы комплемента и ассоциированной активацией системы свертывания крови и/или контактной системы. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение, или состояние ассоциированы со связанным с комплементом воспалением, избыточной активацией системы свертывания крови или контактной системы, инициированной посредством фибрина или активированных тромбоцитов. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из артериального тромбоза, венозного тромбоза, тромбоза глубоких вен, послеоперационного тромбоза, рестеноза после аортокоронарного шунтирования и/или инвазивной сердечно-сосудистой процедуры (например, ангиопластики или стентирования), атеросклероза, разрыва бляшки, нестабильности бляшки, рестеноза, гипотензии, острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), диссеминированного внутрисосудистого свертывания (DIC), веноокклюзионного заболевания (VOD), тромботической микроангиопатии, волчаночного нефрита, поверхностного тромбоза, мутации Лейден фактора V, ишемического/реперфузионного повреждения, инфекции вирусом иммунодефицита человека (HIV), подвергания гормонозаместительной терапии (HRT), болезни Альцгеймера и/или страдания от состояния гиперкоагуляции. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем приобретенное состояние гиперкоагуляции обусловлено по меньшей мере одним или несколькими из следующего: подвергания терапии с использованием лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из 5-FU, GM-CSF, цисплатина, гепарина, ингибитора COX-2, контрастных средств, кортикостероидов и антипсихотических средств; венозного застоя (иммобилизационного, хирургического и т.д.), антифосфолипидного синдрома, злокачественной опухоли (промиелоцитарного лейкоза, опухолей легкого, молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, шейки матки, плоскоклеточной карциномы пищевода, опухолей желудка и ободочной кишки), повреждения ткани из-за травмы или хирургической операции, присутствия катетера в центральной вене, приобретенной недостаточности белка, вовлеченного в формирование сгустка (например, белка C), пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), повышенных уровней гомоцистеина,

сердечной недостаточности, присутствия механического клапана, легочной гипертензии с тромбозом *in-situ*, фибрилляции предсердий, индуцированной гепарином тромбоцитопении (НПТ), индуцированных гепарином тромбоцитопении и тромбоза (НПТТ), заболевания Кавасаки с тромбом *in-situ*, артериита Такаясу с тромбом *in-situ*, тромбофилии при метастазирующей злокачественной опухоли, повышенных уровней фактора VIII, беременности, воспалительного заболевания кишечника (IBD), или обусловлено генетическим дефектом, вызывающим состояние или увеличивающим риск развития состояния гиперкоагуляции, таким как генетический дефект, выбранный из группы, состоящей из мутации 20210 в гене протромбина, мутации MTHFR, недостаточности белка C, недостаточности белка S, недостаточности белка A, недостаточности белка Z, недостаточности антитромбина и генетического нарушения, приводящего к тромбофилии.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой фиброз молочной железы, фиброз мышцы, ретроперитонеальный фиброз, фиброз щитовидной железы, фиброз лимфатического узла, фиброз мочевого пузыря, фиброз миокарда, фиброз печени, артрофиброз, фиброз кожи или фиброз плевры. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой фиброз мягких тканей скелетно-мышечных структур (например, адгезивный капсулит, контрактуру Дюпюитрена, миелодиспластические состояния с увеличенным фиброзом костей, остеопороз, миелофиброз или остеопению, ассоциированную, например, с кистозным фиброзом). В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой фиброз, возникающий в результате вирусной инфекции, такой как инфекция альфа-вируса, инфекция туберкулеза или инфекция гриппа. В некоторых вариантах осуществления связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой рубцевание, ассоциированное с травмой, такое как хирургические осложнения (например, послеоперационные спайки, где рубцовая ткань может формироваться между внутренними органами, вызывая контрактуру, боль, и может вызывать бесплодие), индуцированный химиотерапевтическим лекарственным средством фиброз или рубцевание, ассоциированное с ожогами. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой фиброз репродуктивных органов (например, эндометриоз и болезнь Пейрони).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение поддается лечению с использованием ингибитора калликреина. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание выбрано из группы, состоящей из наследственного ангионевротического отека, диабетического отека желтого пятна и кровотечения во время сердечно-легочного шунтирования. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание поддается лечению с использованием ингибитора тромбина, такое как артериальный тромбоз, венозный тромбоз, легочная эмболия, фибрилляция предсердий, индуцированная

гепарином тромбоцитопения, переход с одного антикоагулянта на другой, или применение средства по незарегистрированным показаниям для проходимости экстракорпорального контура при непрерывной заместительной почечной терапии (CRRT) у пациентов с НИТ в критическом состоянии (поддержание).

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение поддается лечению с использованием ингибитора фактора XII, например, тромбоз глубоких вен (как первичная профилактика, так и расширенная терапия), легочная эмболия, неклапанная фибрилляция предсердий, предотвращение рецидивирующей ишемии после острого коронарного синдрома у субъектов в присутствии или в отсутствие фибрилляции предсердий, почечная недостаточность на конечной стадии, церебральная ишемия, стенокардия, или уменьшение или предотвращение свертывания крови, ассоциированного с медицинскими устройствами (например, клапанами, мелкокалиберными трансплантатами и т.д.) и/или экстракорпоральными контурами.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой приобретенное заболевание или нарушение, увеличивающее предрасположенность к тромбоэмболии, такое как заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, синдрома антифосфолипидных антител, злокачественной опухоли (например, промиелоцитарного лейкоза, злокачественной опухоли легкого, молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка и ободочной кишки), гипергомоцистеинемии, инфекции, повреждения ткани, венозного застоя (например, обусловленного хирургической операцией, ортопедической или паралитической иммобилизацией, сердечной недостаточностью, беременностью или ожирением) и приема субъектом пероральных противозачаточных средств, содержащих эстроген. В некоторых вариантах осуществления, субъект нуждается в антикоагулянтной терапии, и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и/или композиции, описанные в настоящем описании, используют в качестве замены для стандартной антикоагулянтной терапии (например, варфарина). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет состояние, которое в норме препятствует стандартной антикоагулянтной терапии, такое как амилоидная ангиопатия ЦНС. В некоторых вариантах осуществления способа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и/или композиции, описанные в настоящем описании, вводят в качестве переходного средства периоперационно субъекту, в иных обстоятельствах подвергнутому стандартной антикоагулянтной терапии. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой серповидноклеточную анемию, представляющую собой вазоокклюзионное нарушение, вовлекающее активацию тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой инфекцию SARS-CoV-2. Инфекция SARS-CoV-2

может приводить к связанным с лектиновым путем заболеваниям или нарушениям посредством нескольких различных механизмов. В дополнение к острой или хронической инфекции SARS-CoV-2, дополнительные хронические состояния могут запускаться прошлой или текущей инфекцией SARS-CoV-2. Связанные с лектиновым путем заболевания или нарушения, связанные с инфекцией SARS-CoV-2, могут возникать посредством прямого взаимодействия MASP-2 с вирусными белками, такого как связывание MASP-2 с SARS-CoV-2. Например, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение может возникать посредством связывания MASP-2 с белком S или белком N SARS-CoV-2. Альтернативно, некоторые связанные с лектиновым путем заболевания или нарушения могут возникать после взаимодействия узнающих молекул лектинового пути с вирусными гликопротеинами, присутствующими на вирусной поверхности или на поверхности инфицированных вирусом клеток. Кроме того, связанные с лектиновым путем заболевания или нарушения могут возникать в результате активации лектинового пути посредством DAMP, представляемых клетками, инфицированными SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления, инфекция SARS-CoV-2 представляет собой острую инфекцию. В альтернативных вариантах осуществления, инфекция SARS-CoV-2 представляет собой хроническую инфекцию. В конкретных вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой текущее хроническое состояние, вызванное прошедшей инфекцией SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение представляет собой острый респираторный дистресс-синдром. В некоторых вариантах осуществления, связанное с лектиновым путем заболевание или нарушение является вторичным по отношению к инфекции SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, блокируют связывание MASP-2 с белком S и/или белком N SARS-CoV-2.

Избранные примеры связанных с лектиновым путем заболеваний и нарушений более подробно описаны ниже.

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS).

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) является частью группы состояний, названных «тромботические микроангиопатии». В атипичной форме HUS (aHUS), заболевание ассоциировано с дефектной регуляцией комплемента и может являться либо спорадическим, либо семейным. Семейные случаи aHUS ассоциированы с мутациями в генах, кодирующих белки для активации комплемента или регуляции комплемента, включая фактор H, фактор I, фактор В комплемента, мембранный кофакторный белковый ингибитор (CD46), так же как родственный фактору комплемента H белок 1 (CFHR1) и родственный фактору комплемента H белок 3 (CFHR3). (Zipfel, P.F., et al., PloS Genetics 3(3):e41 (2007)). Объединяющим признаком этого разнообразного ряда генетических мутаций, ассоциированных с aHUS, является предрасположенность к усиленной активации комплемента на поверхностях клеток или тканей. Субъект

подвержен риску развития aHUS после начала по меньшей мере одного или нескольких симптомов, показательных для aHUS (например, присутствия анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности), и/или присутствия тромботической микроангиопатии в биоптате, полученном от субъекта. Определение того, подвержен ли субъект риску развития aHUS, включает определение того, имеет ли субъект генетическую предрасположенность к развитию aHUS, которое можно проводить посредством оценки генетической информации (например, из базы данных, содержащей генотип субъекта), или проведения по меньшей мере одного теста генетического скрининга для субъекта для определения присутствия или отсутствия генетического маркера, ассоциированного с aHUS (т.е., определения присутствия или отсутствия генетической мутации, ассоциированной с aHUS, в генах, кодирующих фактор H (CFH), фактор I (CFI), фактор В (CFB) комплемента, мембранный кофакторный белковый ингибитор (CD46), C3, родственный фактору комплемента H белок 1 (CFHR1), или THBD (кодирующем антикоагулянтный белок тромбомодулин), или родственный фактору комплемента H белок 3 (CFHR3), или родственный фактору комплемента H белок 4 (CFHR4)), посредством либо геномного секвенирования, либо геноспецифического анализа (например, анализа ПЦР), и/или определения того, имеет ли субъект семейную историю aHUS. Способы генетического скрининга по присутствию или отсутствию генетической мутации, ассоциированной с aHUS, хорошо разработаны, например, см. Noris M et al. «Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome», 2007 Nov 16 [Updated 2011 Mar 10]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Ассоциированная с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток TMA (HSCT-TMA)

Ассоциированная с трансплантацией гематопозитических стволовых клеток TMA (HSCT-TMA) представляет собой опасное для жизни осложнение, запускаемое повреждением эндотелия. Почка является наиболее часто поражаемым органом, хотя HSCT-TMA может представлять собой мультисистемное заболевание, которое также затрагивает легкие, кишечник, сердце и головной мозг. Возникновение даже мягкой TMA ассоциировано с длительной почечной недостаточностью. Развитие ассоциированной TMA после аллогенной HSCT отличается по частоте, на основании различных диагностических критериев, и подготовительного режима и режима профилактики реакции трансплантат против хозяина, где ингибиторы кальциневрина являются наиболее часто подразумеваемыми лекарственными средствами (Ho VT et al., Biol Blood Marrow Transplant, 11(8):571-5, 2005).

Иммуноглобулин А-нефропатия (IgAN)

Иммуноглобулин А-нефропатия (IgAN) представляет собой аутоиммунное заболевание почек, приводящее к внутривоспалению и повреждению почек. IgAN является наиболее распространенным первичным гломерулярным заболеванием во всем мире. При ежегодной заболеваемости приблизительно 2,5 на 100000, оценивают, что

у 1 из 1400 человек в США может развиваться IgAN. Настолько у многих, как у 40% пациентов с IgAN может развиваться почечная недостаточность (ESRD) на конечной стадии. У пациентов, как правило, проявляется микроскопическая гематурия с протеинурией, от мягкой до умеренной, и изменчивыми уровнями почечной недостаточности (Wyatt R.J., et al., NEngl J Med 36S(25):2402-4, 2013). Клинические маркеры, такие как нарушенная функция почек, длительная гипертензия и тяжелая протеинурия (более 1 г в сутки), ассоциированы с плохим прогнозом (Goto M et al., Nephrol Dial Transplant 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. et al., J Am Soc Nephrol 22(4):752-61, 2011). Протеинурия является наиболее сильным прогностическим фактором, независимым от других факторов риска, во многих крупных наблюдательных исследованиях и проспективных исследованиях (Coppo R. et al., J Nephrol 18(5):503-12, 2005; Reich H. N., et al., J Am Soc Nephrol 18(12):3177-83, 2007). Оценивают, что 15-20% пациентов достигают ESRD в пределах 10 лет от начала заболевания, если оставлены без лечения (D'Amico G., Am J Kidney Dis 36(2):227-37, 2000). Характерным диагностическим признаком IgAN является преобладание накоплений IgA, отдельно или с IgG, IgM, или обоими, в гломерулярном мезангии.

Волчаночный нефрит (LN)

Основным осложнением системной красной волчанки (SLE) является нефрит, также известный как волчаночный нефрит, который классифицируют как вторичную форму гломерулонефрита. Вплоть до 60% взрослых с SLE имеют некоторую форму затрагивания почек позже в ходе заболевания (Koda-Kimble et al., Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs, 10th Ed, Lippincott Williams & Wilkins: pages 792-9, 2012) с встречаемостью 20-70 на 100000 человек в США. Волчаночный нефрит часто присутствует у пациентов с другими симптомами активной SLE, включая утомляемость, лихорадку, сыпь, артрит, серозит или заболевание центральной нервной системы (Pisetsky D.S. et al., Med Clin North Am 81(1): 113-28, 1997). Некоторые пациенты имеют бессимптомный волчаночный нефрит; однако, во время регулярного отслеживания, лабораторные аномалии, такие как повышенные уровни сывороточного креатинина, низкие уровни альбумина, или белок или осадок в моче, позволяют предполагать активный волчаночный нефрит.

VI. Последовательности

Последовательности, на которые ссылаются в настоящем описании, обобщены в ТАБЛИЦЕ 2.

ТАБЛИЦА 2

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
1	MASP-2 человека	MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGE YANDQERRWTLTAPPGYRLRLRYFTHFDLELSHLCEYDF VKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLGSSLDI

		<p>TFRSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPTCDH HCHNHLGGFYCSCRAGYVLHRNKRTCSALCSGQVFTQ RSGELSSPEYPRYPKLSSCTYSISLEEGFSVILDFVESFD VETHPETLCPYDFLKIQTDRREEHGPFCKTLPHRIETKSN TVTITFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGH VSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTAVCQ KDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGVTT YKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE KSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLI LGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDASALDIR MGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALI KLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGL TQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAA YEKPPYPRGSVT ANMLCAGLESGGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWVFG GIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
2	MASP-2 мыши	<p>MRLLI FLG LLW SLV ATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKY ADHQDRSWTLTAPPGYRLRLYFTHFDLELSYRCEYDFV KLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDTFYSLGPSLKVT FHSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDH YCHNYLGGYYCSCRAGYVLHQNKHTCSALCSGQVFTG RSGYLSSPEYPQYPKLSSCTYSIRLEDGFSVILDFVESFD VETHPEAQCPYDSLKIQTDKGEHGPFCKTLPPRIETDS HKVTITFATDESGNHTGWKIHYTSTARPCPDPTAPPNGS ISPVQAIYVLKDRFSVFCKTGFE LLQGSVPLKLSFTAVCQ KDGSWDRPMPECSIIDCGPPDDL PNGHV DYTGPVTTY KAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADGFWTSSKGEKLP PVCEPVCGLSTHTIGGRIVGGQPAKPGDFPWQVLLLGQ TTAAAGALIHDN WVLTA AHAVYEKRMAASSLNIRMG I LKRLSPHYTQAWPEEIFIHEGYTHGAGFDNDIALIKLKN KVTINGSIMPVCLPRKEAASLMRTDFTGT VAGWGLTQK GLLARNLMFVDIPIADHQKCTAVYEKLYPGVRV SANM LCAGLETGGKDS CRGDSGGALVFLDNETQRWFVGGIVS WGSINCGAADQYGVYTKVINIYIPWIENIISNF</p>
3	MASP-2 крысы	<p>MRLLI VLG LLW SLV ATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEK YGNHQDRSWTLTAPPGFRLRLYFTHFNLELSYRCEYDF</p>

		<p>VKLTSGTKVLATLCGQESTDTERAPGNDFYSLGPSLK VTFHSDYSNEKPFTGFYAAEDVDECRTSLGDSVPC DHYCHNYLGGYYCSCRVGYLHQNKHTCSALCSGQVF TGRSGFLSSPEYPQYPKLSSCAYNIRLEEGFSITLDFVES FDVEMHPEAQCPYDSLKIQTDKREYGPFCGKTLPPRIET DSNKVTITFTTDESGNHTGWKIHYTSTAQPCPDPTAPPN GHISPVQATYVLKDSFSVFCKTGFEELLQGSVPLKSFTAV CQKDGSWDRPIPECSIIDCGPPDDLPHGHVDYITGPEVTT YKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADGFWTSSKGEKS LPVCKPVCGLSTHTSGGRIIGGQPAKPGDFPWQVLLLGE TTAAGALIHDDWVLTAHAHAYGKTEAMSSLDIRMGIL KRLSPHYTQAWPEAVFIHEGYTHGAGFDNDIALIKLKN KVTINRNIMPICLPRKEAASLMKTDFVGTVAGWGLTQK GFLARNLMFVDIPIVDHQKCATAYTKQPYPGAKVTVN MLCAGLDAGGKDSRCRGDSGGALVFLDNETQRWFVGGI VSWGSIKCGGSEQYGVYTKVTNYIPWIENIINNF</p>
4	MASP-2 яванского макака	<p>MRLTLLGLLCSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGE YANDQERRWTLTAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDF VKLSSGAKVLATLCGHSTEDTERAPGNDFYSLGSSLDI TFRSDYSNEKPFTGFYAAEDIDECQVAPGEAPACDH HCHNHLGGFYCSCRVGYLHRNKRTCSALCSGQVFTQR SGELSSPEYPQYPKLSSTYSIRLEEGFSVILDFVESFDV ETHPETLCPYDFLKIQIDSEEHGPFCGKTLPRRIETKSNT VTITFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHLS PVQAKYILKDSFSIFCEPGYELLQGHPLKSFAAVCQKD GSWDQPMPCSIIVDCGPPDDLPSGRVEYITGPEVTTYKA VIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGERSP VCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGS TAAGALLYDNWVLTAHAHAIYEQKHDASSLDIRLGALK RLSPHYTQAWAEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNK VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGL LARNLMYVDIPIVDHQKCTAAEYKPPYSGGSVTANMLC AGLESKGGKDSRCRGDSGGALVFLDNETQRWFVGGIVSW GSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIKNIISNF</p>
5	MASP-2 собаки	<p>MRLLLFLGLLCSWAAAAPGPAWSQPLFGRLASPGFPGA</p>

		YANHQERRWALTAPPGYRLRLYFTHFHLELSYLCEYDF VKLSSGTEVLATLCGQESTDTERAPGNDFRSPGSSLDV TFRSDYSNEQPFTGFEAFYAAEDIDECQVSPGEAPPCDH HCHNHLGGFYCSCRQGYVLHRNKRTCSALCAGQVFTG RSGVLSSPEYPQYPKLSSCTYSIRLEEGFSIVLDFVAPFD VESHPDALCPYDSLQVRTDKEEYGPFCGTTLPRIETQS SAVAISFVTDQSGEHAGWRIRYSSSARPCSPVAPPNGRI TPVQAEYVLEDRVAVSCDPGYELLRGSSALESFTAVCQ RDGSWDQPPRCSAVDCGPPDDLPAGRVDFLTGPGVTT YGAGIRYHCDGSFYAMTAGDGKYVCEADGFWTSSKGE KSPPVCEPVCVSTRTTEGRIYGGQKAKLGFDPWQVLL LGRRTAAGALLRDNWILTAHAVYTQKAAASSLDIRM GALKRLSAQYTQARAEAFIHEGYTPDAGFDNDIALIKL KNRVVINSNVLPICLPRKEAESFMRESDIGTASGWGLTQ RGFLARHLMFVDIPIVDHQKCTAAYEKLSYPGGRVTEN MLCAGLEGGGKDSCRGDSSGALVFLDNETQRWVGGI VSWGSTNCGEANQYGVYTKVINYIPWIENIINNF
6	уникальный эпитоп MASP-2	DIRMGTLKRLSPHYTQAW
7	исходное OMS850, VH	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFTNYWMHWL KQRPIQGLEWIGDIDPSDSETHYIEKFKDKATLTIDKSSS TAYMHLSSLTSEDSAIYYCARGDITTLRYFDVWGTGT TDTVSS
8	исходное OMS860, VH	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTNYWMHW VRQRPIQGLEWIGDIDPSDSEIYYNQKFKDKATLTVDKS SSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARGDITTLRYFDVWGT GTTDTVSS
9	исходное OMS870, VH	EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNCNEKFKNKATMTVDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWAYDAMDYWGQG TSVTVSS
10	исходное OMS850, VL	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSSVRYMYWYQQK PGSSPRLIYDTSNLAGVVPVRFSGSGSSTNSLTISRME AEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELKR
11	исходное OMS860, VL	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWYQQKP

		GSSPRLLIYDTSNLAGVPPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEA EDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELKR
12	исходное OMS870, VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHW YQQKPGQAPKLLIYFASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTI DPVEADDAATYFCQQSNEDPLTFGAGTKLELKR
13	OMS850, VH FR1	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT
14	OMS850/860, VH CDR1	NYWMH
15	OMS850, VH FR2	WLKQRPIQGLEWIG
16	OMS850, VH CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD
17	OMS850, VH FR3	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR
18	OMS850/860, VH CDR3	GDITTTLR YFDV
19	OMS850/860, VH FR4	WGTGTTVTVSS
20	OMS860, VH FR1	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT
21	OMS860, VH FR2	WVRQRPIQGLEWIG
22	OMS860, VH CDR2	DIDPSDSEIYYNQKFKD
23	OMS860, VH FR3	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR
24	OMS870, VH FR1	EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT
25	OMS870, VH CDR1	SYWMH
26	OMS870, VH FR2	WVKQRPGQGLEWIG
27	OMS870, VH CDR2	NINPSNGGTNCNEKFKN
28	OMS870, VH FR3	KATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
29	OMS870, VH CDR3	WAYDAMDY
30	OMS870, VH FR4	WGQGTSVTVSS
31	OMS850, VL FR1	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC
32	OMS850, VL CDR1	SASSSVRYMY
33	OMS850/860, VL FR2	WYQQKPGSSPRLLIY
34	OMS850/860, VL CDR2	DTSNLAG
35	OMS850/860, VL FR3	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC
36	OMS850/860, VL CDR3	QQWSSYPLT
37	OMS850/860/870, VL FR4	FGAGTKLELKR
38	OMS860, VL FR1	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITC
39	OMS860, VL CDR1	SASSSVSYMY
40	OMS870, VL FR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC

41	OMS870, VL CDR1	RASESVDSYGNSFMH
42	OMS870, VL FR2	WYQQKPGQAPKLLIY
43	OMS870, VL CDR1	FASNLES
44	OMS870, VL FR3	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFC
45	OMS870, VL CDR3	QQSNEDPLT
46	OMS852, VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHW LRQAPGQGLEWIGDIDPSDSETHYIEKFKDRATLTIDKSS STAYMELSSLRSEDNAVYYCARGDITTTTLRYFDVWGQG TLVTVSS
47	OMS852/854/856/858, VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRYMYWYQQKP GKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGSGTDNTLTISLQP EDFATYYCQQWSSYPLTFGQGTKVEIKR
48	OMS854, VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHW LRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDRATLTIDKS SSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGDITTTTLRYFDVWGQ GTLVTVSS
49	OMS856, VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYHMH LRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDRATLTIDKS SSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGDITTTTLRYFDVWGQ GTLVTVSS
50	OMS858, VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHHMH LRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDRATLTIDKS SSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGDITTTTLRYFDVWGQ GTLVTVSS
51	OMS852/854/856/858, VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
52	OMS852, VH FR2	WLRQAPGQGLEWIG
53	OMS854/856/858, VH CDR2	DIDASDSETHYIEKFKD
54	OMS852/854/856/858, VH FR3	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR
55	OMS852/854/856/858, VH FR4	WGQGTTLVTVSS
56	OMS856, VH CDR1	NYHMH

57	OMS858, VH CDR1	NHHMH
58	OMS852, VL FR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIC
59	OMS852, VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
60	OMS852, VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYC
61	OMS852, VL FR4	FGQGTKVEIKR
62	Не использовали	
63	консенсусная последовательность VH CDR2 для OMS850/852/854/856/858/860	DIDXSDSEXXYXXKFKD, где X в положении 4 представляет собой P или A; X в положении 9 представляет собой T или I; X в положении 10 представляет собой H или Y, X в положении 12 представляет собой I или N; и X в положении 13 представляет собой E или Q
64	консенсусная последовательность VL CDR1 для OMS850/852/854/856/858/860	SASSSVXYMY, где X в положении 7 представляет собой R или S
65	константная область тяжелой цепи IgG4 человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
66	константная область тяжелой цепи IgG4 человека со стабилизирующей мутацией S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS

		VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
67	константная область тяжелой цепи IgG4 человека со стабилизирующей мутацией S228P и мутациями, усиливающими взаимодействие с FcRn при низком pH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYIT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSLGK
68	константная область легкой цепи каппа человека	TVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
69	ДНК, кодирующая OMS850, VH (исходное мышиное)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTG AGGCCTGGGTCTTCAGTGAGGCTGTCCTGCAAGGCTT CTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCATTGGTT GAAGCAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGG TGACATTGACCCTTCTGATAGTGAAACTCACTACATT GAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTATAGAC AAATCCTCCAGCACAGCCTATATGCACCTCAGCAGCC TGACATCTGAGGACTCTGCGATCTATTACTGTGCAAG AGGGGATATTACTACGACCCTTAGGTACTIONTCGATGTC TGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
70	ДНК, кодирующая OMS860, VH (исходное мышиное)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTG AGGCCTGGGTCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT CTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCATTGGGT GAGACAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGG TGACATTGACCCTTCTGATAGTGAAATTTACTACAAT CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGAC AAATCCTCCAGCACCGCCTATATGCACCTCAGCAGCC TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG AGGGGATATTACTACGACCCTTAGGTACTIONTCGATGTC TGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
71	ДНК, кодирующая OMS870, VH (исходное мышиное)	GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT

	мышинное)	CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGT GAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGG AAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTGCAAT GAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACAATGACTGTAGAC AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCC TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAG ATGGGCCTACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
72	ДНК, кодирующая OMS850, VL (исходное мышинное)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTACGTTACATGTACTGGTACCAGCA GAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGAC ACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTAACTCTCTCACAAT CAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCACTCACGTTCCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
73	ДНК, кодирующая OMS860, VL (исходное мышинное)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCA AAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGAC ACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTAACTCTCTCACAAT CAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCACTCACATTCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
74	ДНК, кодирующая OMS870, VL (исходное мышинное)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTG TGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGC CAGTGAAAGTGTTGATAGTTATGGCAACAGTTTTATG CACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAA CTCCTCATCTATTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGG TCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGA CTTACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGAT GCTGCAACCTATTTCTGTCAGCAAAGTAATGAGGATC CGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGA

		AACGG
75	ДНК, кодирующая OMS852, VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAG AAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCC TCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGATGCACTGGC TGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCG GGGATATCGACCCTTCGGACTCCGAAACTCATTACAT TGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGA TAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGC CTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGT CTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGTCTCTCC
76	ДНК, кодирующая OMS852/854/856/858, VL	GATATTCAACTCACCCAGTCCCCTTCATCCCTTTCCGC TTCCGTCCGGTGATAGAGTGACCATCACTTGCTCCGCG AGCTCTAGCGTGCGCTACATGTACTGGTACCAGCAGA AGCCCGGCAAAGCCCCAAAGTTGCTCATCTATGACAC TTCGAACCTGGCCTCCGGGGTGCCGTCACGGTTCTCC GGATCGGGATCGGGAACCGACAACACTCTGACCATT AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GTCAACAGTGGTCCTCCTACCCGCTGACGTTTGGCCA GGGAACCAAGGTTCGAAATCAAGCGG
77	ДНК, кодирующая OMS854, VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAG AAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCC TCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGATGCACTGGC TGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCG GGGATATCGACGCCTTCGGACTCCGAAACTCATTACAT TGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGA TAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGC CTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGT CTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGTCTCTCC
78	ДНК, кодирующая OMS856, VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAG AAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCC TCCGGTTACACTTTCACCAACTATCACATGCACTGGC TGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCG GGGATATCGACGCCTTCGGACTCCGAAACTCATTACAT

		TGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGA TAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGC CTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTAATACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGT CTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGTCCCTCC
79	ДНК, кодирующая OMS858, VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAG AAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCTGCAAAGCC TCCGGTTACACTTTCACCAACCATCACATGCACTGGC TGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCG GGGATATCGACGCCTCGGACTCCGAAACTCATTACAT TGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGA TAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGC CTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTAATACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGT CTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGTCCCTCC

VII. Примеры

Пример 1

Получение высокоаффинных ингибирующих антител против MASP-2 человека

Мышей C57BL/6 с нокаутом MASP-2 в возрасте семи - четырнадцати недель иммунизировали с использованием полипептида MASP-2 CCP2/SP человека (аминокислотные остатки 364-686 из SEQ ID NO:1), включая метку 6xHis на С-конце, с использованием системы адъюванта Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Мышам инъецировали внутрибрюшинно 50 мкг иммуногена на мышь, смешанных 1:1 с адъювантом RIBI. Иммунизированных мышей подвергали бустер-инъекции через 14 суток с использованием дополнительного иммуногена, смешанного 1:1 с адъювантом RIBI. Мышей подвергали бустер-инъекции третий раз через 14 суток с использованием 50 мкг иммуногена, смешанного 1:1 с PBS. Образцы сыворотки от мышей периодически получали посредством отборов крови из хвоста и тестировали посредством ELISA по присутствию антигенспецифических антител. Мышей с значительным титром антитела подвергали бустер-инъекции перед слиянием иммуногена в PBS, за четверо суток до слияния спленоцитов. За трое суток до слияния, мышам вводили подкожно в основание хвоста 50 мкг агонистического mAb против CD40 в PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) для увеличения количеств В-клеток.

Мышей умерщвляли, и клетки селезенки собирали и сливали с выбранной линией клеток мышинной миеломы P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC No. TIB18) с использованием 50% полиэтиленгликоля или 50% полиэтиленгликоля плюс 10% DMSO. Посредством слияний получали клетки гибридомы, которые рассевали в 96-луночные планшеты для

культивирования тканей, содержащие среду HAT (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), для ингибирования пролиферации неслитых клеток, гибридов миеломы и гибридов селезенки. После отбора гибридом, культуральные супернатанты анализировали по связыванию с MASP-2 посредством ELISA и по ингибированию активации лектинового пути с использованием анализа накопления C3. Положительные гибридомы идентифицировали и субклонировали посредством способов серийного разведения. Посредством параллельного скрининга супернатантов гибридомы получили 75 исходных гибридом, которые являлись положительными как по связыванию MASP-2, так и по функции (анализ накопления C3). После дальнейшего культивирования и повторного тестирования 75 исходных гибридом, подтвердили, что 74 являлись положительными по связыванию, в то время как подтвердили, что 39 имели функциональную активность; эти 39 гибридом клонировали посредством серийного разведения.

Пример 2

Клонирование, очистка и характеристика рекомбинантных антител

Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали из 39 клонов гибридомы, идентифицированных, как описано в примере 1, с использованием RT-ПЦР и секвенировали. Мышиные-человеческие химерные mAb, состоящие из вариабельных областей мышиных mAb, слитых с константными областями тяжелой цепи (SEQ ID NO:66) и легкой цепи каппа (SEQ ID NO:68) IgG4 человека, продуцировали в форме рекомбинантных белков в клетках Expi293F. Используемая константная шарнирная область IgG4 (SEQ ID NO:66) содержит стабилизирующую аминокислотную замену S228P. В некоторых вариантах осуществления, химерные mAb сливали с константной шарнирной областью IgG4 человека (SEQ ID NO:67), которая содержит аминокислотную замену S228P, а также содержит конкретные мутации, способствующие взаимодействиям с FcRn при низком pH.

Определили, что 26 клонов представляли собой уникальные химерные моноклональные антитела. Эти химерные моноклональные антитела экспрессировали во временно трансфицированных клетках Expi293F, очищали и тестировали по аффинности связывания с MASP-2 человека и по способности ингибировать опосредованный MASP-2 лектиновый путь активации.

Для измерения связывания 26 очищенных рекомбинантных антител против MASP-2 с MASP-2 человека (фрагментом CCP1-CCP2-SP), твердофазный анализ ELISA проводили следующим образом. Планшет для ELISA MaxiSorp покрывали MASP-2 человека (фрагментом CCP1/2/SP) при 1,0 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере в течение ночи при 4°C. Затем планшет блокировали с использованием 1% BSA/PBS, промывали в PBS и затем инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с серийными разведениями рекомбинантных mAb против MASP-2 в блокирующем буфере (PBST+0,1% BSA). Планшет промывали (PBS-T, 0,05%) и добавляли антитело для детекции (антитело козы против IgG человека с HRP) на один час при комнатной температуре. После другой промывки (PBS-T, 0,05%) планшет проявляли

(5 минут) с использованием OPT EIA TMB (BD Biosciences #555214). Считывание оптической плотности при A450 измеряли с использованием считывателя для планшетов Spectramax M5e.

Обнаружили, что из 26 химерных mAb, 22 имели хорошее связывание с MASP-2 человека (диапазон кажущейся Kd 0,1 нМ - 1 нМ). Обнаружили, что четыре из 26 химерных mAb имели слабое/отрицательное связывание с MASP-2 человека.

Для измерения способности 26 очищенных рекомбинантных антител против MASP-2 блокировать лектиновый путь активации комплемента, анализ накопления C3 проводили следующим образом. Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃+35 мМ NaHCO₃+1,5 мМ NaN₃), pH 9,6, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл 1% BSA в PBS добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS, содержащего 0,05% Tween-20, и сохраняли на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Нормальную сыворотку человека разводили до 1,0% в буфере GVB/Ca/Mg, и 26 очищенных mAb против MASP-2 добавляли в диапазоне концентраций от 0,00001 до 100 нМ к этому буферу, и предварительно инкубировали 10 минут на льду до добавления в заблокированный планшет для ELISA. Реакцию активации комплемента инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в лунки покрытого маннаном планшета для анализа. После инкубации в течение 40 минут при комнатной температуре, реакцию останавливали посредством промывки планшетов три раза в буфере для промывки для ELISA. Накопление C3b детектировали с использованием антитела против C3c человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки (отсутствие накопления C3), и положительный контроль представлял собой сыворотку без ингибирующего антитела (максимальное накопление C3b). Критерий отсека устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

Определили, что из 26 уникальных химерных mAb, идентифицированных в скрининге, три клона с наивысшей активностью ингибирования LP в анализе накопления C3b представляли собой OMS850, OMS860 и OMS870. Эти три антитела были выбраны для дальнейшей характеристики, как описано ниже.

Последовательности переменных областей тяжелых цепей и переменных областей легких цепей клонов OMS850, OMS860 и OMS870 показаны на ФИГУРЕ 3 («SIN»=«SEQ ID NO:» на ФИГУРЕ 3) и включены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) каждого представлены в ТАБЛИЦАХ 1A, 1B и 1C (выше), и ТАБЛИЦАХ 3-6 (ниже).

Ниже представлена последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) для каждого высокоаффинного ингибирующего антитела против MASP-2. CDR по Kabat подчеркнуты.

Вариабельные области тяжелых цепей:

OMS850 VH: SEQ ID NO:7 (исходное мышинное)

QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT**NYWMH**WLKQRPIQGLEWIG**DIDP**
SDSETHYIEKFKDKATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR**GDITTT**RLRYFDV**W**
TGTTVTVSS

OMS860 VH: SEQ ID NO:8 (исходное мышинное)

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT**NYWMH**WVRQRPIQGLEWIG**DIDP**
SDSEIYYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR**GDITTT**RLRYFDV**W**
GTGTTVTVSS

OMS870 VH: SEQ ID NO: 9 (исходное мышинное)

EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**NINP**
SNGGTNCNEKFKNKATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**WAYDAMDY****W**
QGTSVTVSS

ТАБЛИЦА 3: Последовательности VH антител против MASP-2 (области CDR и FR, Kabat), исходные мышинные

Антитело	VH FR1	VH CDR1
OMS850	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT (SIN 13)	NYWMH (SIN 14)
OMS860	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT (SIN 20)	NYWMH (SIN 14)
OMS870	EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SIN 24)	SYWMH (SIN 25)
Антитело	VH FR2	VH CDR2
OMS850	WLKQRPIQGLEWIG (SIN 15)	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS860	WVRQRPIQGLEWIG (SIN 21)	DIDPSDSEIYYNQKFKD (SIN 22)
OMS870	WVKQRPGQGLEWIG (SIN 26)	NINPSNGGTNCNEKFKN (SIN 27)
Антитело	VH FR3	VH CDR3
OMS850	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR (SIN 17)	GDITTTLRIFYDV (SIN 18)
OMS860	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR (SIN 23)	GDITTTLRIFYDV (SIN 18)

OMS870	KATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SIN 28)	WAYDAMDY (SIN 29)
Антитело	VH FR4	
OMS850	WGTGTTVTVSS (SIN 19)	
OMS860	WGTGTTVTVSS (SIN 19)	
OMS870	WGQGTSVTVSS (SIN 30)	

Ниже представлены последовательности переменных областей легких цепей (VL) для высокоаффинных ингибирующих антител против MASP-2. CDR по Kabat подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми, независимо от того, пронумерованы они по системе Kabat или Chothia.

Переменные области легких цепей:

OMS850 VL: SEQ ID NO:10 (исходное мышинное)

QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSSVRYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELKR

OMS860 VL: SEQ ID NO:11 (исходное мышинное)

QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITCSASSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELKR

OMS870 VL: SEQ ID NO:12 (исходное мышинное)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQAPKLLIYF
ASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFCQOSNEDPLTFGAGTKLELKR

ТАБЛИЦА 4: Последовательности VL антител против MASP-2 (области CDR и FR, Kabat), исходные мышинные

Антитело	VL FR1	VL CDR1
OMS850	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC (SIN 31)	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS860	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITC (SIN 38)	SASSVSYMY (SIN 39)
OMS870	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC (SIN 40)	RASESVDSYGNSFMH (SIN 41)
Антитело	VL FR2	VL CDR2
OMS850	WYQQKPGSSPRLLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS860	WYQQKPGSSPRLLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS870	WYQQKPGQAPKLLIY (SIN 42)	FASNLES (SIN 43)
Антитело	VL FR3	VL CDR3
OMS850	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC	QQWSSYPLT (SIN 36)

	(SIN 35)	
OMS860	GVPVRFSGSGSGTNSLTISRMEAEDAATYYC (SIN 35)	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS870	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFC (SIN 44)	QQSNEDPLT (SIN 45)
Антитело VL FR4		
OMS850	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS860	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS870	FGAGTKLELKR (SIN 37)	

ТАБЛИЦА 5: Консенсусные последовательности для VH CDR OMS850 и OMS860:

Антитело	Область	Последовательность
OMS850	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS860	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS852	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS854	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS856	VH-CDR1	NYHMH (SIN 56)
OMS858	HC-CDR1	NHHMH (SIN 57)
Консенсус	VH-CDR1	NXXMH, где X в положении 2 представляет собой H или Y и где X в положении 3 представляет собой H или W
OMS850	VH-CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS860	VH-CDR2	DIDPSDSEIYYNQKFKD (SIN 22)
OMS852	VH-CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS854	VH-CDR2	DID \underline{A} SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS856	VH-CDR2	DID \underline{A} SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS858	VH-CDR2	DID \underline{A} SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
Консенсус	VH-CDR2	DIDXSDSEXXYXXKFKD (SIN 63), где X в положении 4 представляет собой P или A; где X в положении 9 представляет собой T или I; X в положении 10 представляет собой H или Y, X в положении 12 представляет собой I или N; и

		X в положении 13 представляет собой E или Q
OMS850	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS860	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS852	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS854	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS856	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS858	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
Консенсус	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)

ТАБЛИЦА 6: Консенсусные Последовательности для VL CDR OMS850 и OMS860:

Антитело	Область	Последовательность
OMS850	VL-CDR1	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS860	VL-CDR1	SASSSVSYMY (SIN 39)
OMS852	VL-CDR1	SASSSVRYMY (SIN 32)
Консенсус	VL-CDR1	SASSSVXYMY, (SIN 64), где X в положении 7 представляет собой R или S
OMS850	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
OMS860	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
OMS852	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
Консенсус	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
OMS850	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS860	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS852	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
Консенсус	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)

Пример 3

Дальнейшая характеристика ингибирующих антител-кандидатов против MASP-2

1. Связывание с рекомбинантным MASP-2 человека

Твердофазный анализ ELISA проводили для измерения связывания трех выбранных ингибирующих антител против MASP-2 с MASP-2 человека (фрагментом CCP1-CCP2-SP), как описано в примере 1. Результаты показаны на ФИГУРЕ 4A-D и обобщены в ТАБЛИЦЕ 7, ниже.

ТАБЛИЦА 7: Результаты анализа связывания MASP-2

mAb	EC₅₀
OMS850	0,25 нМ
OMS860	0,23 нМ
OMS870	0,41 нМ

2. Анализ накопления C3b в сыворотке человека, яванского макака, крысы и мыши

Три выбранные антитела против MASP-2, описанные в примере 2, экспрессировали, очищали и разводили до одинаковой концентрации препарата для хранения, который опять разводили в содержащем Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺ буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl₂, 2,0 мМ CaCl₂, 0,1% желатин, pH 7,4), чтобы гарантировать наличие одинакового количества буфера во всех клонах антител.

А. Анализ накопления C3b в сыворотке человека

Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃+35 мМ NaHCO₃), pH 9,6 и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл блокирующего раствора 1% BSA в PBS затем добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS, содержащего 0,05% Tween-20 (буфера для промывки для ELISA).

Нормальную сыворотку человека разводили до 1,0% в буфере GVB/Ca/Mg, и клоны mAb против MASP-2 OMS850, OMS860 и OMS870 добавляли в диапазоне конечных концентраций от 0,00001 до 100 нМ, и предварительно инкубировали 15 минут на льду. Реакцию инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в лунки покрытого маннаном, заблокированного планшета для анализа, с последующей инкубацией в течение 40 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали посредством промывки планшета три раза в буфере для промывки, и накопление C3b детектировали с использованием антитела против C3c человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки и антитела (приводящий к отсутствию накопления C3b), и положительный контроль представлял собой сыворотку без антитела (максимальное накопление C3b). Критерий отсекаания устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

В. Анализ накопления C3b в сыворотке яванского макака

Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃+35 мМ NaHCO₃), pH 9,6, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл блокирующего раствора 1% BSA затем добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS/tween-20.

Сыворотку яванского макака разводили до 0,25% в буфере GVB/Ca/Mg, и клоны mAb против MASP-2 OMS850, OMS860 и OMS870 добавляли в диапазоне конечных

концентраций от 0,00001 до 100 нМ и предварительно инкубировали 15 минут на льду. Реакцию инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в лунки покрытого маннаном, блокированного планшета для анализа, с последующей инкубацией в течение 40 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали посредством промывки планшета три раза с использованием PBS/Tween-20. Накопление C3b детектировали с использованием антитела против C3c человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки и антитела (приводящий к отсутствию накопления C3b), и положительный контроль представлял собой сыворотку без антитела (максимальное накопление C3b). Критерий отсекаемости устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

С. Анализ накопления C3 в сыворотке крысы

Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3 +35 мМ NaHCO_3 +1,5 мМ NaN_3), pH 9,6, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл блокирующего раствора 1% BSA затем добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS/tween-20

Сыворотку крысы разводили до 0,3% в буфере GVB/Ca/Mg, и клоны mAb против MASP-2 OMS850, OMS860 и OMS870 добавляли в диапазоне конечных концентраций от 0,00001 до 100 нМ и предварительно инкубировали 15 минут на льду. Реакцию инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в лунки покрытого маннаном, блокированного планшета для анализа, с последующей инкубацией в течение 40 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали посредством промывки планшета три раза буфером для промывки. Накопление C3b детектировали с использованием антитела против C3c человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки и антитела (приводящий к отсутствию накопления C3b), и положительный контроль представлял собой сыворотку без антитела (максимальное накопление C3b). Критерий отсекаемости устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

D. Анализ накопления C3b в сыворотке мыши

Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3 +35 мМ NaHCO_3 +1,5 мМ NaN_3), pH 9,6, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл блокирующего раствора 1% BSA в PBS затем добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS/tween-20.

Сыворотку мыши разводили до 1,0% в буфере GVB/Ca/Mg, и клоны mAb против MASP-2 OMS850, OMS860 и OMS870 добавляли в диапазоне конечных концентраций от 0,00001 до 100 нМ, и предварительно инкубировали 15 минут на льду. Реакцию инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в лунки

покрытого маннаном, заблокированного планшета для анализа, с последующей инкубацией в течение 40 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали посредством переноса планшетов в ледяную баню. Накопление С3b детектировали с использованием антитела против С3с человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки и антитела (приводящий к отсутствию накопления С3b), и положительный контроль представлял собой сыворотку без антитела (максимальное накопление С3b). Критерий отсека устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

Результаты показаны на ФИГУРАХ 5А, 5В, 5С и 5D и обобщены в ТАБЛИЦЕ 8, ниже. Точка данных, обозначенная как «буфер» на ФИГУРАХ 5А-D, представляет собой отрицательный контроль только с буфером.

ТАБЛИЦА 8: Результаты анализа накопления С3b

mAb	Человек (IC ₅₀ нМ)	Яванский макак (IC ₅₀ нМ)	Крыса (IC ₅₀ нМ)	Мышь (IC ₅₀ нМ)
OMS850	0,15	0,4	0,05	0,5
OMS860	0,6	26,2	0,3	5,8
OMS870	0,13	18,9	0,6	>100

3. Анализ накопления С4b в 50% сыворотке человека

Маннан разводили до концентрации 50 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃+35 мМ NaHCO₃+1,5 мМ NaN₃), pH 9,6, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, 250 мкл блокирующего раствора 1% BSA в PBS затем добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X с использованием 300 мкл PBS/tween-20.

Нормальную сыворотку человека разводили до 50,0% в PBS, и клоны mAb против MASP-2 OMS850, OMS860 и OMS870 добавляли в диапазоне конечных концентраций от 0,0001 до 100 нМ к этому буферу и предварительно инкубировали 15 минут на льду. Реакцию инициировали посредством переноса смесей после предварительной инкубации в покрытый маннаном, заблокированный планшет для ELISA, с последующей инкубацией в течение 7 минут при 4°C. накопление С4b детектировали с использованием антитела против С4с человека (Dako), за которым следовало антитело козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech). Отрицательный контроль представлял собой буфер без сыворотки и антитела (= отсутствие накопления С4b). Фон определяли в лунках, в которые вводили только буфер. Критерий отсека устанавливали на половину активности не относящегося к делу mAb и буфера отдельно.

Результаты показаны на ФИГУРЕ 6 и представлены в ТАБЛИЦЕ 9, ниже. Точка данных, обозначенная как «буфер» на ФИГУРЕ 6, представляет собой отрицательный контроль только с буфером.

ТАБЛИЦА 9: Результаты анализа накопления С4b

mAb	Накопление C4b человека (IC₅₀ мкг/мл)
OMS850	0,07
OMS860	0,1
OMS870	0,09

Антитело OMS850 было выбрано для гуманизации и дальнейшей оптимизации, принимая во внимание хорошую активность у человека, мыши, крысы и яванских макаков, как описано выше.

Пример 4

Гуманизация mAb против MASP-2 OMS850 и получение вариантов

До гуманизации, ингибирующее mAb против MASP-2 OMS850 анализировали по посттрансляционной модификации. Мотив изомеризации аспарагиновой кислоты «DP» идентифицировали в VH CDR2 (DIDPSDSETHYIEKFKD (SEQ ID NO: 16)) OMS850. Варианты OMS850 получали посредством сайт-направленного мутагенеза для модификации P53 до A, N, D, L, S и T. Варианты экспрессировали и очищали, как описано выше. Аффинность определяли посредством ELISA, и активность оценивали посредством анализа накопления C3 в сыворотке человека с использованием форматов интактного IgG4, как описано выше.

Результаты показаны на ФИГУРЕ 7 и представлены в ТАБЛИЦЕ 10, ниже.

ТАБЛИЦА 10: Результаты анализа накопления C3b

mAb	Накопление C3b человека (IC₅₀ нМ)
OMS850	0,09
OMS850_VH_P53/A	0,07
OMS850_VH_P53/N	0,53
OMS850_VH_P53/D	0,16

Как показано на ФИГУРЕ 7, в анализе накопления C3b определили, что OMS850 VH P53A имело наилучшую активность в сыворотке человека, как измерено в анализе накопления C3b. Таким образом, эту замену P53A включали в ходе последующей гуманизации, описанной ниже.

Для уменьшения риска иммуногенности, репрезентативное высокоаффинное ингибирующее антитело MASP-2 OMS850 гуманизировали посредством способа прививки CDR. CDR из mAb OMS850 прививали в наиболее близкие консенсусные человеческие каркасные последовательности. Некоторые из остатков зоны Верньера модифицировали посредством сайт-направленного мутагенеза Quickchange (Agilent Technologies). Полученные гуманизированные области VH и VL переносили в экспрессирующие IgG4 и IgK человека конструкции на основе pcDNA3.1, и рекомбинантные антитела экспрессировали и очищали, как описано выше. Аффинность гуманизированных антител определяли посредством ELISA, и активность оценивали

посредством анализа накопления C3 с использованием форматов интактного IgG4 в 1% сыворотке человека с использованием способов, описанных выше в примере 3.

Первый гуманизированный прототип был разработан и обозначен OMS852. Аминокислотные последовательности гуманизированных вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи OMS852 представлены ниже. CDR (Kabat) подчеркнуты.

Полная последовательность VH OMS852 (гуманизированная): (SEQ ID NO: 46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWLRQAPGQGLEWIGDID
PSDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTTLRYFDVWG
QGTLVTVSS

Полная последовательность VL OMS852 (гуманизированная) (SEQ ID NO: 47)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAS
GVPSRFGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYCQOWSSYPLTFGQGTKVEIKR

Результаты анализа накопления C3b с использованием различных модифицированных вариантов mAb OMS850, по сравнению с исходным mAb OMS850, показаны на ФИГУРЕ 8А и ФИГУРЕ 8В, и обобщены в ТАБЛИЦЕ 11.

ТАБЛИЦА 11: Результаты анализа накопления C3b для гуманизированных кандидатов из OMS850

mAb	Накопление C3b человека (IC₅₀ нМ)
OMS850, исходное	0,15; 0,12
OMS852 (4-11)	0,16
OMS852 (4PA-2)	0,12; 0,10
OMS852 (4PA-4)	0,15
OMS852 (4PA-1)	0,09
OMS852 (4PA-6)	0,17

Моноклональное антитело OMS852 4PA-1, которое как является гуманизированным, так и включает модификацию P53A, идентифицированную ранее, было выбрано для дальнейшего усовершенствования, и было обозначено OMS854.

Аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелых цепей и вариабельные областей легких цепей для гуманизированного антитела OMS854 представлены ниже. CDR (Kabat) подчеркнуты.

Полная последовательность VH OMS854: (SEQ ID NO: 48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWLRQAPGQGLEWIGDID
ASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTTLRYFDVWG
QGTLVTVSS

Полная последовательность VL OMS854 (гуманизированная) (SEQ ID NO: 47)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAS
GVPSRFGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYCQOWSSYPLTFGQGTKVEIKR

Как показано в ТАБЛИЦЕ 12, дополнительные модификации были внесены в VH CDR1, так чтобы она включала по меньшей мере один, или, необязательно, два, или, необязательно, три остатка гистидина. Вариант с двумя остатками гистидина был обозначен OMS856. Вариант с тремя остатками гистидина был обозначен OMS858.

Полная последовательность VH OMS856 (SEQ ID NO:49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYHMHWLRQAPGQGLEWIGDID
ASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTTLRYFDVWG
QGTLVTVSS

Полная последовательность VH OMS858 (SEQ ID NO:50)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHHMHWLRQAPGQGLEWIGDID
ASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTTLRYFDVWG
QGTLVTVSS

ТАБЛИЦА 12: Последовательности VH антител против MASP-2 (области CDR и FR, Kabat)

Антитело	VH FR1	VH CDR1
OMS850	QVQLQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT (SIN 13)	NYWMH (SIN 14)
OMS852	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYWMH (SIN 14)
OMS854	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYWMH (SIN 14)
OMS856	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYHMH (SIN 56)
OMS858	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NHHMH (SIN 57)
Антитело		
	VH FR2	VH CDR2
OMS850	WLKQRPIQGLEWIG (SIN 15)	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS852	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS854	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DIDASDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS856	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DIDASDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS858	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DIDASDSETHYIEKFKD

		(SIN 53)
Антитело	VH FR3	VH CDR3
OMS850	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR (SIN 17)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS852	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS854	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS856	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS858	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
Антитело	VH FR4	
OMS850	WGTGTTVTVSS (SIN 19)	
OMS852	WGQGTLVTVSS (SIN 55)	
OMS854	WGQGTLVTVSS (SIN 55)	
OMS856	WGQGTLVTVSS (SIN 55)	
OMS858	WGQGTLVTVSS (SIN 55)	

ТАБЛИЦА 13: Последовательности VL антитела против MASP-2 (области CDR и FR, Kabat)

Антитело	VL FR1	VL CDR1
OMS850	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC (SIN 31)	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS852	DIQLTQSPSSLASVGDRVTITC (SIN 58)	SASSSVRYMY (SIN 32)
Антитело	VL FR2	VL CDR2
OMS850	WYQQKPGSSPRLLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS852	WYQQKPGKAPKLLIY (SIN 59)	DTSNLAS (SIN 34)
Антитело	VL FR3	VL CDR3
OMS850	GVPVRFSGSGSGTNSLTISRMEAEDAATYYC (SIN 35)	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS852	GVPSRFSGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYC	QQWSSYPLT(SIN 36)

	(SIN 60)	
Антитело	VL FR4	
OMS850	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS852	FGQGTKVEIKR (SIN 61)	

SEQ ID NO:65: константная область IgG4 человека

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 66: константная область IgG4 человека с мутацией S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 67: константная область IgG4 человека с мутацией S228P, а также мутацией (Xtend), способствующей взаимодействиям с FcRn при низком pH

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:68: константная область IgK человека

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:69: ДНК, кодирующая OMS850, VH (исходное мышинное)

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTTCAG
TGAGGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCATTGGT
TGAAGCAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGGTGACATTGACCCTTCTGATA
GTGAAACTCACTACATTGAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTATAGACAAA
TCCTCCAGCACAGCCTATATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGATC
TATTACTGTGCAAGAGGGGATATTACTACGACCCTTAGGTA CTTCGATGTCTGGGGC
ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:70: ДНК, кодирующая OMS860, VH (исходное мышинное)

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTTCAG
 TGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCATTGGG
 TGAGACAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGGTGACATTGACCCTTCTGATA
 GTGAAATTTACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAA
 TCCTCCAGCACCGCCTATATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTC
 TATTACTGTGCAAGAGGGGATATTAACGACCCCTTAGGTAATTCGATGTCTGGGGC
 ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:71: ДНК, кодирующая OMS870, VH (исходное мышинное)

GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAG
 TGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGAAATATTAATCCTAGCAAT
 GGTGGTACTAAGTCAATGAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACAATGACTGTAGACAA
 ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT
 CTATTATTGTGCAAGATGGGCCTACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC
 AGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:72: ДНК, кодирующая OMS850, VL (исходное мышинное)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAA
 GGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTACGTTACATGTAAGTACTGGTACCAGCA
 GAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGG
 AGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTAACTCTCTCACAATCAG
 CCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAAGTCCAGCAGTGGAGTAGTTACCC
 ACTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:73: ДНК, кодирующая OMS860, VL (исходное мышинное)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAA
 GGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTACATGTAAGTACTGGTACCAGCA
 AAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGG
 AGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTAACTCTCTCACAATCAG
 CCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAAGTCCAGCAGTGGAGTAGTTACCC
 ACTCACATTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:74: ДНК, кодирующая OMS870, VL (исходное мышинное)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG
 GGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGATAGTTATGGCAACAGTTTTAT
 GCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCCTCATCTATTTTGCATC
 CAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTT
 CACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTTCTGTCAGCA
 AAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:75: ДНК, кодирующая VH OMS852

CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCAGC
 GTGAAAGTGTGCTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGATGCACTGG
 CTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACCCTTCGGA

CTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGATA
 AGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTGCT
 GTGTACTIONTGTGCGCGGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGTCTGG
 GGACAGGGCACCCCTTGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:76: ДНК, кодирующая VL OMS852

GATATTCAACTCACCCAGTCCCCTTCATCCCTTTCCGCTTCCGTCCGGTGATAG
 AGTGACCATCACTTGCTCCGCGAGCTCTAGCGTGCCTACATGTACTIONGGTACCAGCA
 GAAGCCCGGCAAAGCCCCAAAGTTGCTCATCTATGACACTTCGAACCTGGCCTCCGG
 GGTGCCGTACGGTTCTCCGGATCGGGATCGGGAACCGACAACACTCTGACCATTA
 GCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTIONTGTCAACAGTGGTCTCTCTACC
 CGCTGACGTTTGGCCAGGGAACCAAGGTTCGAAATCAAGCGG

SEQ ID NO:77: ДНК, кодирующая OMS854

CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCAGC
 GTGAAAGTGTCTGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGATGCACTGG
 CTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTCGGA
 CTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGATA
 AGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTIONTGT
 GTGTACTIONTGTGCGCGGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGTCTGG
 GGACAGGGCACCCCTTGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:78: ДНК, кодирующая OMS856

CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCAGC
 GTGAAAGTGTCTGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATCACATGCACTGG
 CTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTCGGA
 CTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGATA
 AGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTIONTGT
 GTGTACTIONTGTGCGCGGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGTCTGG
 GGACAGGGCACCCCTTGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:79: ДНК, кодирующая OMS858

CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCAGC
 GTGAAAGTGTCTGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACCATCACATGCACTGG
 CTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTCGGA
 CTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTCACCATCGATA
 AGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTIONTGT
 GTGTACTIONTGTGCGCGGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTIONTCGACGTCTGG
 GGACAGGGCACCCCTTGTGACCGTGTCTCTCC

Пример 5

Антитело OMS858 специфически блокирует лектиновый путь

Эффект mAb OMS858 на накопление мембраноатакующего комплекса (МАС) анализировали с использованием специфических для пути условий для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели, использовали набор для

скрининга компонента Wieslab COMPL300 (Wieslab, Lund, Sweden), следуя инструкциям производителя. Для классического пути, компонент активировали на IgM. Для лектинового пути, компонент активировали на маннаны, и для альтернативного пути, компонент активировали на LPS.

На ФИГУРЕ 9А графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для классического пути. На ФИГУРЕ 9В графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для лектинового пути. На ФИГУРЕ 9С графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 OMS858 в условиях анализа, специфических для альтернативного пути.

Как показано на ФИГУРЕ 9В, mAb OMS858 блокирует опосредованную лектиновым путем активацию накопления MAC с значением IC_{50} приблизительно 1 нМ. Однако, mAb OMS858 не оказывало эффекта на накопление MAC, возникшее в результате опосредованной классическим путем активации (ФИГУРА 9А) или в результате опосредованной альтернативным путем активации (ФИГУРА 9С). Антитело против C1s (TNT003), которое, как известно, ингибирует классический путь, включено в качестве контроля на ФИГУРЕ 9А. Антитело против фактора В, которое, как известно, ингибирует альтернативный путь, включено в качестве контроля на ФИГУРАХ 9В и 9С.

Пример 6

Анализ связывающих эпитопов MASP-2 для антител OMS850, OMS858, OMS860, OMS870

Антитело OMS858 биотинилировали и тестировали по способности к связыванию, конкурентному с несколькими различными антителами против MASP-2, в анализе связывания посредством интерферометрии биослоя Octet, следующим образом.

Антитело OMS858 биотинилировали с использованием EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Fischer Scientific, A39257). Биосенсор со стрептавидином Super Streptavidin (SSA) (Fortebio 18-5057) гидратировали в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. 3 мл 50 нМ биотинилированного OMS858 связывали на чипе BLI, с последующим связыванием hMASP-2-CCP1-CCP2-SP. 500 нМ раствор одного из пяти тестируемых антител против MASP-2 получали в буфере для иммобилизации (PBS, 0,02% BSA, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Тестируемые антитела представляли собой OMS850, OMS860 и OMS870, получение которых описано выше, и ранее идентифицированные антитела против MASP-2 OMS721 и 4A8.

В лунки планшета в первом столбце вводили 200 мкл биотинилированного OMS858, и в лунки в следующем столбце вводили 200 мкл hMASP-2-CCP1-CCP2-SP. В отдельном столбце на планшете, 200 мкл 500 нМ тестируемых антител добавляли в каждую лунку. Контроль также осуществляли с использованием небитинилированного OMS858 или буфера отдельно, вместо тестируемого антитела.

Анализ связывания проводили в Octet с использованием следующих стадий: установление фона (60 с), загрузка биотинилированного OMS858 (180 с), установление фона (60 с), загрузка hMASP-2-CCP1-CCP2-SP (180 с), с последующим связыванием тестируемого антитела (300 с) и диссоциацией (300 с).

Как показано на ФИГУРЕ 10, антитела OMS850, OMS860 и OMS870 являлись неспособными связываться с MASP-2, связанным посредством OMS858, что указывает на то, что эти антитела связываются с одним и тем же или частично перекрывающимся эпитопом на MASP-2. В отличие от этого, ранее идентифицированные антитела против MASP-2 OMS721 и 4A8 являлись способными связываться с MASP-2, связанным посредством OMS858, что указывает на то, что эти два антитела связываются с эпитопом на MASP-2, отличным от OMS850, OMS860, OMS870 и OMS858.

Пример 7

Кристаллизация комплекса белка MASP-2 и Fab mAb OMS858

1. Получение белка MASP-2

Рекомбинантный MASP-2 белок, на основании UniProt O00187, связывающей маннан лектиновой сериновой протеазы 2 человека, получали следующим образом. Получали экспрессирующие конструкции для CCP2-SP и CCP2-SP-6HIS MASP-2 человека для рекомбинантной экспрессии в клетках *E.coli*. Рекомбинантную экспрессию MASP-2 в *E.coli* в форме телец включения и очистку белка проводили, в соответствии со способами, описанными в Ambrus G. et al., 2003, с незначительными модификациями. Для снабженного меткой HIS варианта, белок MASP-2 (CCP2-SP-6HIS) очищали в денатурирующих условиях, в соответствии со способами, описанными в Ni-NTA Superflow Cartridge Handbook, Qiagen, March 2007.

Очистка MASP-2 включала экстракцию, разворачивание, повторное сворачивание и хроматографию с использованием стандартных способов, как описано в Harmat et al., J. Mol. Biol. 2004;342:1533-1546; и Gal et al., J. Biol. Chem. 2005;280:33435-33444; и Ambrus et al. J Immunol. 2003 Feb 1;170(3):1374-82. После эксклюзионной хроматографии, рекомбинантный белок MASP-2 концентрировали от 5 мг/мл до 20 мг/мл с использованием концентратора-центрифуги (Amicon NMWL 10kDa). Образцы концентрированного белка MASP-2 мгновенно замораживали и сохраняли до размораживания для формирования комплексов. Очистку и расщепление монитировали посредством SDS-PAGE с окрашиванием посредством Кумасси синего Simply Blue™ Safe Stain (Invitrogen).

2. Получение белка Fab mAb OMS858

Fab OMS858 получали посредством подвергания mAb OMS858 протеолитическому расщеплению с использованием набора для Fab FAbALACTICA®, в соответствии с инструкциями производителя.

3. Получение комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858

Образцы белков Fab mAb OMS858 и MASP-2 инкубировали в равной молярной концентрации в течение часа. Успешное получение комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858 подтверждали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии.

4. Кристаллизация комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858

Исследования кристаллизации организовывали как эксперименты по диффузии паров в сидячей капле посредством объединения равных объемов раствора комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858 с коммерчески доступными составами для кристаллизации. Образцы белка комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858 использовали при концентрации белка 5-20 мг/мл. Кристаллы MASP-2-Fab mAb OMS858 возникали в пределах менее чем двух месяцев в составе для кристаллизации, содержащем 100 мМ ацетат натрия, pH 5,26, 200 мМ сульфат аммония, 10,45% PEG 2000 MME. Кристаллы захватывали с использованием криогенных петель, обеспечивали криозащиту с использованием 20% глицерина в составе для кристаллизации перед мгновенным замораживанием в жидком азоте.

Пример 8

Рентгеновская кристаллография

Кристаллы комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858, полученные, как описано в примере 7, подвергали дифракции с использованием синхротронного рентгеновского излучения с длиной волны 1,0 Å, и наборы данных рентгенодифракции собирали в пучках излучения SSRL BL9-2, BL14-1, BL12-2, так же как секторе 5 ALS с использованием детекторов Dectris Pilatus и Eiger. Обобщение параметров кристаллов, сбора данных и статистики уточнения для кристаллов комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858 представлены в ТАБЛИЦЕ 14. Рентгеновскую структуру определяли посредством молекулярного замещения с использованием частей структуры 1Q3X и частей 3C08 в качестве моделей поиска, и частично уточняли с использованием Buster 2.10.2 или Refmac 5.8. Электронные плотности проверяли с использованием Coot (Emsley et al., 2010) и подвергали повторяющимся циклам построения и уточнения моделей, пока плотности MASP-2 и Fab mAb OMS858 не становились ясно видимыми, и R-факторы достаточными; в этой точке частичное уточнение считали завершенным, и проверяли модели для лиганда, растворителя и белка.

ТАБЛИЦА 14. Обобщение параметров кристаллов, сбора данных и статистики уточнения для кристаллов комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858

Сбор данных и статистика уточнения	
Пространственная группа	C 1 2 1
Параметры элементарной ячейки	a=169,37Å, b=69,04Å, c=81,76Å, α=90,0°, β=98,17°, γ=90,0°
Сбор данных	

Длина волны (Å)	1,0
Диапазон разрешения (Å)	39,6-2,90 (3,08-2,90)
Количество наблюдений	85344
Количество уникальных отражений	20232
Завершенность (%)	96,9 (94,0)
Среднее I/σ(I)	7,0 (1,0)
Rmerge на I (%)	12,1 (132,0)
Rmeas на I (%)	13,9 (152,0)
Rp.i.m. на I (%)	6,7 (74,1)
Модель и статистика уточнения	
Диапазон разрешения (Å)	39,6-2,90
Количество отражений (общее)	19207
Количество отражений (тест)	963
Завершенность (% от общего)	96,27%
Критерии отсечения F >0	26,9
Rcryst	30,7
Rfree	
Стереохимические параметры	
Ограничители RMSD длины связи (Å)	0,007
Ограничители RMSD угла связи (°)	1,71
Среднее изотропное значение B, белок (Å ²)	94,9
Ошибка координат (на основании анализа максимального правдоподобия, Å)	0,47
Остатки белка	689
Карта Рамачандрана: остатки (%) в	71,7%/15,7%

предпочитаемой/допустимой области	
-----------------------------------	--

Пример 9

Анализ структуры кристаллов

Уточненные структуры анализировали по типам и расстояниям для взаимодействия белок-белок и белок-растворитель, с использованием LigPlot+ (Laskowski and Swindells, 2011), с параметрами, установленными на 3,35 Å для максимального расстояния между донором и акцептором водородной связи; и параметры контактов между гидрофобными без связывания на любые контакты, такие как взаимодействия Ван-дер-Ваальса с максимальным расстоянием контакта 3,90 Å.

В ТАБЛИЦЕ 15 показаны Н-связи между атомами mAb OMS858 и MASP-2. В ТАБЛИЦЕ 16 показаны взаимодействия Ван-дер-Ваальса атомов MASP-2 с атомами Fab mAb OMS858, полученные в результате анализа на основе LigPlot+ кристаллографической структуры, с использованием установки «Антитело». В LigPlot+ это называют «несвязанные контакты» или «гидрофобные контакты». Независимо от наименования, присутствуют спаривания атомов, включающие возможные Н-связи. Таким образом, в некоторых случаях, ТАБЛИЦА 16 также содержит взаимодействия Н-связей.

ФИГУРА 11 представляет собой схематическую диаграмму, показывающую аранжировку домена сериновой протеазы MASP-2 и Fab mAb OMS858, и контакты между ними.

ФИГУРА 12А представляет собой схематическую диаграмму, показывающую эпитоп MASP-2, с которым связывается mAb OMS858, включающий следующие остатки в домене SP MASP-2: ASP496; LYS503; SER506; PRO507; HIS508 и TRP513. Как показано на ФИГУРЕ 12А, эпитоп, с которым связывается OMS858, охватывает два отрезка, где первый включает ASP496 и TRP513, и второй включает LYS503; SER506; PRO507 и HIS508.

ФИГУРА 12В представляет собой схематическую диаграмму, показывающую паратоп mAb OMS858, который связывается с эпитопом MASP-2, показанным на ФИГУРЕ 12А. Как показано на ФИГУРЕ 12В, паратоп охватывает два соединенных, соответствующих отрезка, в которые вносят вклады тяжелая и легкая цепь, и в частности, остатки тяжелой цепи HIS33; ASP50; ASP52; ASP55; GLU57; HIS59 и остатки легкой цепи TYR31; ARG30 и TRP90.

Определили, что присутствуют три водородные связи и 36 контактов Ван-дер-Ваальса, следующим образом:

ТАБЛИЦА 15: 3 Н-связи между атомами mAb OMS858 и MASP-2:

Донор	MASP-2	#	атом	Акцептор	Цепь	#	атом	Расстояние
HIS	A	508	NE2	ASP	H	50	OD2	2,36
LYS	A	503	NZ	ASP	H	55	OD2	3,01
LYS	A	503	NZ	ASP	H	52	OD2	3,17

ТАБЛИЦА 16: 36 контактов Ван-дер-Ваальса между атомами mAb OMS858 и MASP-2:

mAb	Цепь	#	Атом	MASP-2	Цепь	#	Атом	Расстояние
ARG	L	30	CB	TRP	A	513	CZ2	3,34
TYR	L	31	CE2	TRP	A	513	CH2	3,83
ARG	L	30	CB	TRP	A	513	CE2	3,88
HIS	H	59	CD2	HIS	A	508	CD2	3,71
HIS	H	59	NE2	HIS	A	508	CD2	3,73
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CD2	3,81
HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CD2	3,82
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	CD2	3,75
ASP	H	50	OD2	HIS	A	508	CD2	3,23
TRP	L	90	CH2	HIS	A	508	NE2	3,83
HIS	H	59	CD2	HIS	A	508	NE2	3,69
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	NE2	3,34
HIS	H	59	CB	HIS	A	508	NE2	3,56
ASP	H	50	CG	HIS	A	508	NE2	3,41
TRP	L	90	CZ2	HIS	A	508	CE1	3,89
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CE1	3,88
HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CE1	3,22
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	CE1	3,33
HIS	H	59	CB	HIS	A	508	CE1	3,46
ASP	H	50	OD2	HIS	A	508	CE1	3,42
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	ND1	3,46
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	ND1	3,70
HIS	H	59	NE2	HIS	A	508	CG	3,73
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CG	3,39
HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CG	3,52
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CB	3,76
HIS	H	33	CE1	PRO	A	507	CD	3,72
HIS	H	33	ND1	PRO	A	507	CD	3,70
HIS	H	33	CE1	SER	A	506	CA	3,70
GLU	H	57	CB	LYS	A	503	NZ	3,1
ASP	H	55	CG	LYS	A	503	NZ	3,49
ASP	H	52	CB	LYS	A	503	NZ	3,86
ASP	H	55	OD2	LYS	A	503	CE	3,29
ASP	H	52	OD2	LYS	A	503	CE	3,57
ASP	H	52	OD2	LYS	A	503	CD	3,18
TYR	L	31	CE2	ASP	A	496	OD2	3,73

На ФИГУРЕ 13 проиллюстрированы взаимодействия между паратопом mAb OMS858 и эпитопом MASP-2, как вычислено посредством программного обеспечения LigPlot+, с использованием режима «Антитело» с установками для параметров расчета водородной связи (3,35 Å для максимального расстояния между донором и акцептором водородной связи; и параметров несвязанного контакта между гидрофобными для любых контактов, таких как взаимодействия Ван-дер-Ваальса с максимальным расстоянием контакта 3,90 Å), с использованием моделей, выведенных из соответствующих кристаллографических совместных структур MASP-2-соединение. Водородные связи и полярные контакты изображены как прерывистые линии, с расстояниями, представленными в единицах Ангстрем.

Изображены атомы для аминокислот, взаимодействующие с атомами соединения, так же как атомы соединения, имеющие достаточную электронную плотность $2f_0 - f_c$ по кристаллографическим данным. Нумерация аминокислотных остатков MASP-2 (MASP-2 АК#) приведена в соответствии с кодом доступа Uniprot O00187, нумерация атомов для аминокислот (атомов АК) - в соответствии с условными обозначениями, разработанными Protein Data Bank, и соответствует обозначениям в ТАБЛИЦАХ 15 и 16.

Нумерация аминокислотных остатков OMS858 приведена в соответствии с VH, указанной как SEQ ID NO:50, и VL, указанной как SEQ ID NO:47. Паратоп OMS858, включая переменную область тяжелой цепи (петля H1, петля H2) и переменную область легкой цепи (петля L3, петля L1), изображен выше пунктирной линии на ФИГУРЕ 13, и эпитоп MASP-2 изображен ниже пунктирной линии на ФИГУРЕ 13. Некоторые из аминокислот, показанные на ФИГУРЕ 13, имеют дуги с расходящимися лучами, которые указывают, что они имеют взаимодействия Ван-дер-Ваальса (точечные линии) с атомами других аминокислот. Водородные связи и полярные контакты изображены как прерывистые линии с расстояниями, представленными в единицах Ангстрем. Атомы углерода показаны как закрашенные круги; атомы азота показаны как незакрашенные круги с крестом; и атомы кислорода показаны как незакрашенные круги с х. Боковые цепи аминокислот Glu57 и Arg30 из OMS858 были только частично разрешены в рентгеновской структуре. Таким образом, дополнительные водородные связи и ионные взаимодействия OMS858, вероятно, существуют между VH GLU57 и VL ARG30 из OMS858 и противоположными остатками на MASP-2, с учетом тесной близости остова. Конкретно, VL ARG30 из OMS858 может образовывать ионную связь с ASP496 из MASP-2, и VL ARG30 из OMS858 может образовывать π - π -стэкинг-взаимодействие с ароматической группой TRP513 из MASP-2, и VH GLU57 из OMS858 может образовывать ионную связь или водородную связь с аминокислотной группой LYS503 из MASP-2).

Как показано на ФИГУРЕ 13, OMS858 связывается с MASP-2 посредством 3 H-связей с остатками: ASP52 и ASP55 в VH, связывающимися с LYS503 в MASP-2, и ASP50 в VL, связывающимися с HIS508 в MASP-2. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 13, OMS858 связывается с MASP-2 посредством контактов Ван-дер-Ваальса между HIS33 из VH и SER506 и PRO507 из MASP-2; ASP52, ASP55 и GLU57 из VH и LYS503 из MASP-2; HIS59 и ASP50 из VH и HIS508 из MASP-2, TRP90 из VL и HIS508; ARG30 из VL и TRP513 из MASP-2, и TYR31 из VL и TRP513 и ASP496 из MASP-2.

В конкретных аспектах, ингибирующее антитело против MASP-2 взаимодействует посредством контактов Ван-дер-Ваальса с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или всеми из следующих остатков из MASP-2: SER506, PRO507, LYS503; HIS508; TRP513; ASP496 и их комбинациями. В конкретных аспектах, ингибирующее антитело против MASP-2 взаимодействует посредством водородных связей с 1 или 2 из следующих остатков из MASP-2: LYS503 и HIS508.

На ФИГУРЕ 14А проиллюстрирована трехмерная структура эпитопа MASP-2, содержащего ASP496, LYS503, SER506, PRO507, HIS508 и TRP513, с которыми

связывается OMS858. Как показано на ФИГУРЕ 14А, полный эпитоп MASP-2 указан как DIRMGTLKRLSPHYTQAW (SEQ ID NO:6), соответствующий аминокислотным остаткам 496-513 MASP-2 человека (SEQ ID NO:1), локализованным на отдельном элементе антипараллельная бета-цепь-петля-бета-цепь.

На ФИГУРЕ 14В проиллюстрирована трехмерная структура паратопа OMS858, содержащего HIS33, ASP50, ASP52, ASP55, GLU57 и HIS59 тяжелой цепи, и ARG30, TYR31 и TRP90 легкой цепи, с которым связывается MASP-2. HIS33 расположен на петле H1. ASP50, ASP52, ASP55, GLU57, HIS59 формируют элемент антипараллельная бета-цепь-петля-бета-цепь. TYR31 и ARG30 находятся на петле 1 легкой цепи, и TRP90 находятся на петле L3 легкой цепи.

На ФИГУРЕ 15 проиллюстрированы контакты между эпитопом MASP-2 DIRMGTLKRLSPHYTQAW (SEQ ID NO:6), и вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи OMS858. В частности, как показано на ФИГУРЕ 15, остатки вариабельной области тяжелой цепи ASP55, GLU57 и ASP52 взаимодействуют с LYS503 из MASP-2; и остатки вариабельной области тяжелой цепи HIS33, HIS59 и ASP50 взаимодействуют с SER506, HIS508 и PRO507 из MASP-2. Как дополнительно показано на ФИГУРЕ 15, остаток TRP90 вариабельной области легкой цепи взаимодействует с PRO507 и HIS508 из MASP-2, и остатки ARG30 и TYR31 вариабельной области легкой цепи взаимодействуют с ASP496 и TRP513 из MASP-2.

В конкретных аспектах, аминокислотные остатки 496-513 SP MASP-2 из SEQ ID NO:1 (DIRMGTLKRLSPHYTQAW, указанные как SEQ ID NO:6) взаимодействуют с OMS858 посредством взаимодействий Ван-дер-Ваальса. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса включают слабые, электростатические силы притяжения с малым радиусом действия между незаряженными молекулами, возникающие в результате взаимодействия постоянных или временных электрических дипольных моментов.

Как показано в ТАБЛИЦЕ 16, атом СВ ARG30 LC OMS858 взаимодействует с атомами CZ2 и CE2 в TRP513 MASP-2. Атом CE2 TYR31 LC взаимодействует с атомом CH2 TRP513 MASP-2. Атомы CD2, NE2, CE1, ND1 и CG HIS59 HC взаимодействуют с атомом CD2 в HIS508 MASP-2. Атом OD2 ASP50 HC взаимодействует с атомом CD2 в HIS508 MASP-2. Атом CH2 TRP90 LC взаимодействует с атомом NE2 в HIS508 MASP-2. Атомы CD2, CG и СВ HIS59 HC взаимодействуют с атомом NE2 в HIS508 MASP-2. Атом OD2 ASP50 HC взаимодействует с атомами CD2 и CE1 в HIS508 MASP-2. Атом CZ2 TRP90 LC взаимодействует с атомом CE1 из HIS508 MASP-2. Атомы CE1, ND1, CG, СВ и OD2 HIS59 HC взаимодействуют с атомом CE1 в HIS508 MASP-2. Атомы CE1 и CG HIS59 HC взаимодействуют с атомом ND1 в HIS508 MASP-2. Атомы NE2, CE1 и ND1 HIS59 HC взаимодействуют с атомом CG в HIS508 MASP-2. Атом ND1 HIS59 HC взаимодействует с атомом CG в HIS508 MASP-2. Атом CE1 HIS59 HC взаимодействует с атомом СВ в HIS508 MASP-2. Атом CG ASP50 HC взаимодействует с атомом NE2 в HIS508 MASP-2. Атомы CE1 и ND1 HIS33 HC взаимодействуют с атомом CD в PRO507 MASP-2. Атом CE1 HIS33 HC взаимодействует с атомом СА в SER506 MASP-2. Атом СВ

GLU57 HC взаимодействует с атомом NZ в LYS503 MASP-2. Атом CG ASP55 HC взаимодействует с атомом NZ в LYS503 MASP-2. Атом CB ASP52 HC взаимодействует с атомом NZ в LYS503 MASP-2. Атом OD2 ASP55 HC взаимодействует с атомом CE в LYS503 MASP-2. Атом OD2 ASP52 HC взаимодействует с атомами CE и CD в LYS503 MASP-2. Атом CE2 TYR 31 LC взаимодействует с атомом OD2 в ASP496 MASP-2.

В общем, анализ кристаллической структуры ингибирующего антитела MASP-2 OMS858 показывает, что это антитело связывается с новым эпитопом ${}_{496}\text{DIRMGTLKRLSPHYTQAW}_{513}$ (SEQ ID NO:6) в домене сериновой протеазы MASP-2 человека. Следует отметить, что этот связывающий домен эпитопа отделен от области активной триады (остатков HIS483, ASP532 и SER633) сериновой протеазы. Кроме того, следует отметить, что присутствует перекрывание между новым эпитопом ${}_{496}\text{DIRMGTLKRLSPHYTQAW}_{513}$ (SEQ ID NO:6) в домене сериновой протеазы MASP-2 человека и участком взаимодействия с C4 на MASP-2, который включает остатки LYS503 и TRP513 (см. Kidmose et al., Proc Natl Acad Sci USA 109:15425 (2012)). Таким образом, остатки LYS503 и TRP513 из MASP-2 человека могут являться вовлеченными в связывание как OMS858, так и C4.

Расположение mAb OMS858 с MASP-2, как описано на ФИГУРАХ 11-15, следует расположению стандартного формата узнавания антитело-антиген и подразумевает механизм действия, где активность лектинового пути ингибируется посредством конкуренции OMS858 с C4 за связывание с MASP-2.

Хотя этот анализ кристаллической структуры проводили только для комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858, как показано в примере 6, не только исходное mAb OMS850 проявляет перекрестную конкуренцию с OMS858, как ожидали, но mAb OMS860 и mAb OMS870 также проявляют перекрестную конкуренцию с OMS858. Таким образом, эпитопы связывания с OMS860 и OMS870 являются такими же, как эпитоп, или перекрываются с эпитопом на сериновой протеазе MASP-2, идентифицированным посредством анализа комплекса MASP-2-Fab mAb OMS858. В отличие от этого, ингибирующие антитела против MASP-2 4A8 и OMS721 не проявляют перекрестную конкуренцию с OMS858, и таким образом, связывают отдельный эпитоп на MASP-2.

Пример 10

Получение подобного собачьему MASP-2 человека для анализа роли HIS508 в связывании OMS858

Как описано в примере 9, структурное исследование комплекса MASP-2/OMS858 показало, что HIS508 является ключевой боковой цепью связывающего эпитопа, поскольку она взаимодействует как с тяжелой, так и с легкой цепью варибельного домена OMS858 посредством Н-мостика с ASP50 и пи-взаимодействия с TRP90 и HIS59.

ФИГУРА 16 представляет собой выравнивание аминокислот доменов сериновой протеазы (SP) MASP-2 из MASP-2 человека (ак 445-686 из SEQ ID NO:1); MASP-2 яванского макака (ак 445-686 из SEQ ID NO:4); MASP-2 собаки (ак 445-686 из SEQ ID

NO:5); MASP-2 мыши (ак 444-685 из SEQ ID NO:2): и MASP-2 крысы (ак 444-685 из SEQ ID NO:3).

SEQ ID NO:1: MASP-2 человека: (NP_006601.2)

MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPEYANDQERRWTLTAPPG
YRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLGSSLD
ITFRSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPTCDHHCHNHLGGFYCSCRAGYVL
HRNKRTCSALCSGQVFTQRSSELSSPEYPRYPKLSSTYSISLEEGFSVILDFVESFDVET
HPETLCPYDFLKIQTDRREEHGPFCKTLPRIETKSNTVTITFVTDES GDHTGWKIH YTST
AQPCPYMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTAVCQKDGSDW
RMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEA
DGFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLLGGTTAAGALL
YDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFD
NDIALIKLNNKVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLARNLMYVDIP
IVDHQKCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLES GGK DSCRGDSSGALVFLDSETERW FV
GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF

SEQ ID NO:2: MASP-2 мыши (NP_001003893.1)

MRLLI FLG LLW SLV ATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPPG
YRLRLYFTHFDLELSYRCEYDFVKLSSGKVLATLCGQESTDTEQAPGNDFYSLGPSLK
VTFHSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGYV
LHQNKHTCSALCSGQVFTGRSGYLSSPEYPQYPKLSSTYSIRLEDGFSVILDFVESFDV
ETHPEAQCPYDSLKIQTDKGEHGPFCKTLPRIETDSHKVTITFATDESGNHTGWKIH Y
TSTARPCPDPTAPPNGSISPVQAIYVLKDRFSVFCKTGFE LLQGSVPLKSFTAVCQKDGS
WDRPMPECSIIDCGPPDDL PNGHV DYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCE
ADGFWTSSKGEKLPVCEPVCGLSTHTIGGRIVGGQPAKPGDFPWQVLLLGQTAAAGA
LIHDNWVLTAAHAVYEKRMAASSLNIRMGILKRLSPHYTQAWPEEIFIHEGYTHGAGFD
NDIALIKLKNKVTINGSIMPVCLPRKEAASLMRTDFTGTVAGWGLTQKGLLARNLMFV
DIPIADHQKCTAVYEKLYPGVRVSANMLCAGLETGGK DSCRGDSSGALVFLDNETQRW
FVGGIVSWGSINCGAADQYGVYTKVINYIPWIENIISNF

SEQ ID NO:3: MASP-2 крысы (NP_742040.1)

MRLLI VLG LLW SLV ATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYGNHQDRSWTLTAPPG
FRLRLYFTHFNLELSYRCEYDFVKLTSGTKVLATLCGQESTDTERAPGNDFYSLGPSLK
VTFHSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRTSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRVG YIL
HQNKHTCSALCSGQVFTGRSGFLSSPEYPQYPKLSSCAYNIRLEEGFSITLDFVESFDVE
MHPEAQCPYDSLKIQTDKREYGPFCGKTLPPRIETDSNKVTITFTTDESGNHTGWKIH Y
STAQPCPDPTAPPNGHISPVQATYVLKDSFSVFCKTGFE LLQGSVPLKSFTAVCQKDGSW
DRPIPECSIIDCGPPDDL PNGHV DYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADG
FWTSSKGEKSLPVCKPVCGLSTHTSGGRIIGGQPAKPGDFPWQVLLGETTAAGALIHD
DWVLTAAHAVY GKTEAMSSLDIRMGILKRLSPHYTQAWPEAVFIHEGYTHGAGFDNDI
ALIKLKNKV TINRNIMPICLPRKEAASLMKTD FVGTVAGWGLTQKGLLARNLMFVDIPI

VDHQKCATAYTKQPYPGAKVTVNMLCAGLDAGGKDSCRGDSSGGALVFLDNETQRWF
VGGIVSWGSSINCGGSEQYGVYTKVTNYIPWIENIINNF

SEQ ID NO:4: MASP-2 яванского макака (XP_005544869.1), прогнозированный

MRLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAPPG
YRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGHESDTERAPGNDFYSLGSSLD
ITFRSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPACDHHCHNHLGGFYCSCRVGYILH
RNKRTCSALCSGQVFTQRSSELSSPEYPQYPKLSSTYSIRLEEGFSVILDFVESFDVETH
PETLCPYDFLKIQIDSEEHGPFCKTLPRRIETKSNTVTITFVTDES GDHTGWKIHYTSTA
QPCPYPMAPPNGHLSVPQAKYILKDSFSIFCEPGYELLQGHLPKSF AAVCQKDGSWDQ
PMPSCSIVDCGPPDDLPSGRVEYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD
GFWTSSKGERSPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGSTAAGALLY
DNWVLTA AHAIYEQKHDASSLDIRLGALKRLSPHYTQAWAEAVFIHEGYTHDAGFDND
IALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGLLARNLMYVDIPIV
DHQKCTAAAYEKPPYSGGSVTANMLCAGLES GGKDSCRGDSSGGALVFLDNETQRWFG
GIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINIYIPWIKNIISNF

SEQ ID NO:5: MASP-2 собаки (XP_544572.4)

MRLLLFLGLLCGWAAAAPGPAWSQPLFGRLASPGFPGAYANHQERRWALTAPP
GYRLRLYFTHFHLELSYLCEYDFVKLSSGTEVLATLCGQESTDTERAPGNDFRSPGSSL
DVTFRSDYSNEQPFTGFEAFYAAEDIDECQVSPGEAPPCDHHCHNHLGGFYCSCRQGYV
LHRNKRTCSALCAGQVFTGRSGVLSSPEYPQYPKLSSTYSIRLEEGFSIVLDFVAPFDV
ESHDPALCPYDSLQVRTDKEEYGPFCGTTLPRIETQSSAV AISFVTDQSGEHAGWRIRY
SSSARPCSPVAPPNGRITPVQAEYVLEDRVAVSCDPGYELLRGSSALESFTAVCQRDGS
WDQPPPRCSAVDCGPPDDLPAGRVDFLTGPGVTTYGAGIRYHCDGSFYAMTAGDGKY
VCEADGFWTSSKGEKSPPVCEPVCVSTRTTEGRIYGGQKAKLGDFPWQVLLLGRTTA
AGALLRDNWILTA AHAVYTQKAAASSLDIRMGALKRLSAQYTQARAE AIFIHEGYTPD
AGFDNDIALIKLKNRVVINSNVLPICLPRKEAESFMRS EDIGTASGWGLTQRGFLARHLM
FVDIPIVDHQKCTAAAYEKLSYPGGRVTENMLCAGLEGGGKDSCRGDSSGGALVFLDNET
QRWFGVGGIVSWGSTNCGEANQYGVYTKVINIYIPWIENIINNF

Рекомбинантные белки MASP-2 из яванского макака и из мыши получали для оценки перекрестной реакционной способности в отношении видов для антитела OMS858. ДНК, кодирующую каталитический фрагмент (домены CCP1-CCP2-SP) MASP-2 человека, амплифицировали посредством ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (New England BioLabs) и клонировали в вектор pET-17b (Novagen) с использованием набора для клонирования In-Fusion HD (Clontech). 6xHis-метку присоединяли к С-концу полипептида для очистки. Получали также сходные конструкции для экспрессии MASP-2 яванского макака и мыши.

Кроме того, получали «подобный собачьему» вариант MASP-2 человека. Обнаружили, что OMS858 не ингибировал лектиновый путь активации в сыворотке собаки (данные не представлены). Как показано на ФИГУРЕ 16, MASP-2 собаки и MASP-2 человека отличаются по последовательности. Одно такое изменение встречается в

остатке, соответствующем H1S508 в MASP-2 человека, который представляет собой GLN в MASP-2 собаки. По прогнозам, глутамин в MASP-2 собаки хорошо взаимодействует только с одной из двух аминокислот паратопа, с которыми взаимодействует гистидин в MASP-2 человека, в результате ослабляя взаимодействие между MASP-2 собаки и OMS858, по сравнению с MASP-2 человека. Для получения подобного собачьему варианту MASP-2 человека, мутацию H508Q вводили посредством основанного на ПЦР сайт-направленного мутагенеза с использованием ДНК-полимеразы PfuUltra II fusion HS (Agilent). На основании данных кристаллической структуры, ожидали, что OMS858 может иметь более низкую аффинность для этой мутации H508Q MASP-2, по сравнению с H508 человека дикого типа.

Всеми экспрессирующими конструкциями трансформировали *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen), и рекомбинантные белки экспрессировали, в соответствии с протоколом производителя, и очищали посредством аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC) с использованием никелевой колонки. Целостность белка и ферментативную активность очищенных белков оценивали посредством SDS-PAGE и анализа расщепления пептидов, соответственно.

Интерферометрию биослоя (BLI) использовали для анализа связывания антитела OMS858 с множеством белков MASP-2. Все измерения проводили с использованием системы Octet RED96 (ForteBio), с использованием PBS, содержащего 1% BSA и 0,02% Tween 20, в качестве буфера для анализа. OMS858 (50 нМ) сначала загружали на связывающие биосенсоры против Fc человека (ForteBio). После одной стадии установления фона, сенсоры после связывания погружали в лунки, содержащие различные концентрации белков-мишеней (1,6-50 нМ) для стадии связывания (120 с), и затем переносили в пустые лунки для стадии диссоциации (200 с). Во всех экспериментах, сенсор после связывания погружали также в лунку, не содержащую аналита, чтобы позволить вычитание одного контроля для компенсации естественной диссоциации связанного антитела. Зарегистрированные сенсограммы связывания анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных Octet (ForteBio), для определения аффинности связывания (KD).

ТАБЛИЦА 17: Связывание OMS858 с MASP-2

Белок MASP-2	OMS858, KD
CCP1/CCP2/SP MASP-2 человека	4,52 нМ
CCP1/CCP2/SP MASP-2 H508Q человека, «подобного собачьему»	□ 2 мкМ
CCP1/CCP2/SP MASP-2 яванского макака	8,23 нМ
CCP1/CCP2/SP MASP-2 мыши	32,9 нМ

Как показано в ТАБЛИЦЕ 17, у MASP-2 человека с «подобной собачьей» мутацией H508Q уменьшена аффинность связывания приблизительно в 450 раз.

Пример 11

Исследование для яванского макака: PK/PD OMS856 и OMS858

Наивным яванским макакам (n=3) вводили OMS856 и OMS858 при 1,5 мг/кг, либо *iv*, либо *sc*. Образцы крови собирали от каждого животного на сутки -7 и затем через 0,083, 1, 4, 24, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840 и 1008 часов после дозирования, и тестировали по присутствию активности лектинового пути и по количеству введенного антитела.

Анализ лектинового пути проводили в планшетах для ELISA, покрытых 5 мкг/мл маннана в течение ночи при 4°C. Затем планшеты блокировали с использованием 1% BSA в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре. Сыворотку яванского макака разводили в два раза в PBS и добавляли в покрытые маннаном лунки, и инкубировали при 4°C в течение 14 минут. После этого, планшеты промывали три раза в PBS/tween-20, и накопление C4 анализировали посредством использования в качестве зонда антитела кролика против C4с человека (Dako), с последующим добавлением антитела козы против антител кролика с HRP (Southern Biotech).

На ФИГУРЕ 17А и ФИГУРЕ 17В графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после *iv* введения 1,5 мг/кг OMS856 или OMS858, соответственно.

На ФИГУРЕ 18А и ФИГУРЕ 18В графически проиллюстрирована активность лектинового пути в зависимости от времени для яванских макаков после *sc* введения 1,5 мг/кг OMS856 или OMS858, соответственно.

Как показано на ФИГУРЕ 17А и ФИГУРЕ 18А, для яванских макаков показано длительное системное ингибирование лектинового пути после *iv* и *sc* введения 1,5 мг/кг OMS856.

Как показано на ФИГУРЕ 17В и ФИГУРЕ 18В, для яванских макаков показано длительное системное ингибирование лектинового пути после *iv* и *sc* введения 1,5 мг/кг OMS858.

Пример 12

Анализ OMS858 в модели тромбоза на мышцах

Проводили исследование для определения минимальной эффективной дозы и максимального эффекта OMS858 в модели индуцированной хлоридом окклюзии сонной артерии у мышей.

Левую сонную артерию самцов мышей C57B1/6 обнажали и миниатюрный датчик потока (0,7 мм) из Transonic устанавливали вокруг сосуда. После введения тестируемого соединения, формирование тромба индуцировали посредством наложения фрагмента фильтровальной бумаги (1,5 мм x 1 мм), насыщенной 3,5% FeCl₃. Фильтровальную бумагу помещали непосредственно на сонную артерию в контакте с адвентициальной поверхностью сосуда. После 3 минут воздействия, фильтровальную бумагу удаляли, и сосуд промывали солевым раствором. Кровоток в сонной артерии непрерывно регистрировали до полной окклюзии сосуда или в течение максимального периода 45 минут. Время до окклюзии (ТТО) определяли как время от нанесения FeCl₃ до падения кровотока ниже 0,1 мл/мин в течение по меньшей мере 30 секунд, или до того, как

амплитуда сигнала уменьшится достаточно, чтобы предотвращать визуализацию сердцебиения посредством датчика. Сосуды, не подвергнувшиеся окклюзии по окончании периода наблюдения 45 мин, оценивали в баллах с ТТО 45 мин.

Мышам (n=8 для каждой группы дозирования) вводили OMS858 посредством sc инъекции за 24 часа до исследования в следующих дозах: 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10мг/кг и 30 мг/кг. Ацетилсалициловую кислоту (ASA) при 30 мг/кг, введенную за один час до воздействия FeCl₃, использовали в качестве положительного контроля. Не относящееся к делу антитело использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты показаны в ТАБЛИЦЕ 18 и графически проиллюстрированы на ФИГУРЕ 19. Как показано в ТАБЛИЦЕ 18 и на ФИГУРЕ 19, максимальный эффект OMS858 являлся сравнимым с ASA. Как дополнительно показано в ТАБЛИЦЕ 18 и на ФИГУРЕ 19, OMS858 являлось эффективным в наиболее низкой тестируемой дозе (1 мг/кг). ТТО у подвергнутых обработке носителем контрольных мышей составляло 14,7±4,6 минут. Как ожидали, предварительная обработка с использованием ASA значимо продлевала ТТО до 36,4±5,7 минут, в то время как предварительная обработка с использованием антитела для контроля изотипа значимо не продлевала ТТО (9,3±1,5 минут), что подтверждает пригодность тестовой системы. Предварительная обработка мышей с использованием OMS858 в дозах 1, 3, 10 и 30 мг/кг значимо продлевала ТТО (40,4±4,6, 37,0±5,2, 39,1±3,9 минут и 37,4±5,0, соответственно) по сравнению с группой носителя. Явного взаимодействия дозы-ответа невозможно было наблюдать среди оцененных доз OMS858. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, что указывает на то, что максимального фармакологического эффекта можно было достигать при уровне дозы 1 мг/кг SC в этой модели на мышах.

ТАБЛИЦА 18: Время до окклюзии сонной артерии после индуцированного FeCl₃ повреждения сосуда

Тестируемый препарат	Доза (мг/кг)	ТТО (минут) Среднее±SEM	N	Значение p против носителя
Носитель	-	14,7±4,6	8	-
ASA	30	36,4±5,7*	8	0,010
OMS858	1	40,4±4,6*	8	0,002
OMS858	3	37,0±5,2*	8	0,006
OMS858	10	39,1±3,9*	8	0,001
OMS858	30	37,4±5,0*	8	0,005
Контроль изотипа	10	9,3±1,5	8	0,286

* $p < 0,05$, по сравнению с контрольным носителем; значения p получали с использованием одностороннего непарного критерия Стьюдента для одной выборки; ASA=аспирин; N=количество мышей/группу обработки; SEM=стандартная ошибка среднего; ТТО=время до окклюзии

Пример 13

Эффект OMS858 на индуцированную классическим, лектиновым и альтернативным путем активацию C5b-9 в сыворотке человека

Для оценки функциональной избирательности ингибирования лектинового пути посредством OMS858, использовали набор для скрининга системы комплемента Wieslab®. Функциональную активность OMS858 оценивали посредством предварительной инкубации образцов сыворотки человека с серийно разведенным OMS858, с последующей активацией комплемента в специфических для пути условиях анализа и количественной оценкой накопления C5b-9.

Образцы сыворотки человека, разведенные в специфических для пути буферах для анализа, предварительно инкубировали с серийными разведениями OMS858, с последующей инкубацией в соответствующих лунках для анализа Wieslab®, предварительно покрытых специфическим для классического пути (А), специфическим для лектинового пути (В) или специфическим для альтернативного пути (С) активатором комплемента в течение 1 часа при 37°C. Накопление терминального продукта активации комплемента C5b-9 (также обозначенного как МАС) количественно оценивали с использованием конъюгированного с щелочной фосфатазой антитела, специфического для неоантигена C5b-9.

Как показано на ФИГУРАХ 20А-20С, OMS858 ингибировало индуцированную лектиновым путем активацию C5b-9 с значением IC₅₀ 0,81 нМ (121,5 нг/мл), без влияния на индуцированную классическим или альтернативным путем активацию C5b-9 при концентрациях вплоть до 500 нМ.

Пример 14

Дальнейшая характеристика связывания моноклонального антитела OMS858 с MASP-2 человека

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) использовали для определения констант скорости связывания и диссоциации (k_{on} и k_{off} , соответственно) для взаимодействия зимогенной и каталитически активной форм MASP-2 человека в жидкой фазе с иммобилизованным OMS858. Оптимизированные способы и серии концентраций использовали для детальной характеристики взаимодействия, и полученные константы скорости использовали для расчета равновесной константы диссоциации (KD) для взаимодействия OMS858-MASP-2.

k_{on} и k_{off} для связывания каталитически активного MASP-2 с OMS858 составляли $3,38 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и $9,71 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ соответственно, с получением значения KD 287 пМ. k_{on} и k_{off} для связывания зимогена MASP-2 с OMS858 составляли $2,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и $1,72 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ соответственно, с получением значения KD 715 пМ. См. ТАБЛИЦУ 19.

ТАБЛИЦА 19: Связывание OMS858 с зимогенной и активной формами MASP-2 человека

Форма MASP-2	k_{on} ($M^{-1} c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
Каталитически активный MASP-2	$3,38 \times 10^7$	$9,71 \times 10^{-3}$	287
Зимоген MASP-2	$2,41 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-4}$	715

Специфичность связывания OMS858 для MASP-2 оценивали посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Рекомбинантные MASP-2 или C1r, C1s, CFD, MASP-1 и MASP-3 человека иммобилизовали на полистирольных планшетах, и измеряли зависимость ответа от дозы для связывания OMS858. Кажущуюся константу диссоциации (K_D) оценивали посредством нелинейной регрессии с использованием 4-параметрической логистической модели.

Тестировали два различных лота OMS858. Средняя кажущаяся K_D для связывания OMS858 с MASP-2 человека составляла 0,047 мкг/мл. Значимого связывания с C1r, C1s, MASP-1, MASP-3 или фактором D не наблюдали при концентрациях OMS858 вплоть до 100 мкг/мл, что указывает на то, что OMS858 имеет по меньшей мере 2000-кратную избирательность для MASP-2, по сравнению с близко родственными сериновыми протеазами из системы комплемента. Кратность избирательности рассчитывали как $K_D(\text{родственная сериновая протеаза})/\text{средняя } K_D(\text{MASP-2})$. См. ТАБЛИЦУ 20.

ТАБЛИЦА 20: Избирательность связывания OMS858 с MASP-2, по сравнению с родственными сериновыми протеазами из системы комплемента

	Значения кажущейся K_D для связывания с OMS858 [мкг/мл]					
	MASP-2	MASP-1	MASP-3	C1r	C1s	CFD
Лот #1	0,042	>100	>100	>100	>100	>100
Лот #2	0,051	>100	>100	>100	>100	>100
Среднее	0,047	>100	>100	>100	>100	>100
Кратность избирательности		>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Пример 15

Характеризация функциональной активности моноклонального антитела OMS858 у различных видов млекопитающих

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), измеряющий зависимость от лектина активацию C4 в 50% сыворотке, использовали для характеристики функциональной активности OMS858 в сыворотке человека, яванского макака, собаки, кролика и в плазме мыши с гирудином. Функциональную активность OMS858 оценивали посредством предварительной инкубации образцов сыворотки или плазмы с гирудином от соответствующих видов с серийно разведенным OMS858, с последующим добавлением

смеси в лунки покрытого маннаном планшета для ELISA, что запускает зависимую от лектина активацию C4 *in vitro*. Функциональную активность ингибирования посредством OMS858 активности MASP-2 оценивали посредством анализа кривой зависимости ответа от концентрации для ингибирования лектинового пути и определения значения IC₅₀.

В сыворотке человека, для OMS858 показано сильное ингибирование зависимой от лектина активации комплемента со средним значением IC₅₀ 1,09 нМ (164 нг/мл). Средние значения IC₅₀ OMS858 для ингибирования лектинового пути активации, измеренные в сыворотке яванского макака и плазме мыши, составляли 44,1 нМ (6,620 мкг/мл) и 11,9 нМ (1,79 мкг/мл), соответственно. В отличие от этого, OMS858 заметно не ингибировало зависимую от лектина активацию комплемента в сыворотках от кролика и собаки при концентрациях вплоть до 500 нМ. См. ТАБЛИЦУ 21. Сравнение функциональной активности для мыши и яванского макака с активностью для человека показало, что OMS858 имеет в 10,9 раз и 40,5 раз более низкую функциональную активность у этих видов, по сравнению с активностью у человека, соответственно. Активность, относительно человека, рассчитывали как отношение значения IC₅₀ запрашиваемого вида к IC₅₀, полученной для сыворотки человека. См. ТАБЛИЦУ 22.

ТАБЛИЦА 21: Значения IC₅₀ для ингибирования лектинового пути посредством OMS858 в сыворотке мыши, кролика, собаки и яванского макака, по сравнению с человеком

	Значение IC ₅₀ (нМ)				
	Человек	Мышь	Кролик	Собака	Яванский макак
Эксперимент 1	0,89	9,59	>500	>500	42,8
Эксперимент 2	0,86	11,2	>500	>500	44
Эксперимент 3	1,52	14,8	>500	>500	45,5
СРЕДНЕЕ	1,09	11,9	N/A	N/A	44,1

ТАБЛИЦА 22: Активность среди видов, относительно человека

Тестируемый вид	Отношение (IC ₅₀ -запрашиваемого/IC ₅₀ -человека)
Человек	1
Мышь	10,9
Кролик	N/A
Собака	N/A

Обезьяна	40,5
----------	------

Пример 16

Фармакодинамика OMS858 у мыши и яванского макака

PD активности (ингибирования активности лектинового пути) измеряли после подвергания сыворотки воздействию *ex vivo* покрытой маннаном поверхности, с последующей оценкой активации комплемента с использованием электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECLIA). У мышей, накопление фрагмента, полученного в результате активации комплемента, для индивидуального животного, сравнивали со средним накоплением фрагмента, полученного в результате активации комплемента, в образцах, собранных в исходной точке/от контрольных животных, и данные представляли как процент ингибирования. У обезьян, индивидуальные данные накопления C4 сравнивали с исходным ответом для индивидуального животного и представляли как процент ингибирования.

Результаты для мышей показаны на ФИГУРЕ 24. Присутствовала высокая изменчивость исходной активности LP у мышей, как измерено посредством ECLIA. Не присутствовало поддающегося детекции PD эффекта при 0,1 мг/кг. Однако, среднее ингибирование MASP-2 составляло более чем 50% вплоть до 72 часов после дозирования в группе SC дозы 0,3 мг/кг, вплоть до 504 часов после дозирования в группе IV дозы 1 мг/кг, и вплоть до 1008 часов после дозирования в группах SC дозы 1 и 3 мг/кг. В дополнение к тенденции к увеличению длительности эффекта с увеличением уровня дозы, присутствовала тенденция к увеличенному ингибированию MASP-2 при более высоких концентрациях OMS858. Концентрации OMS858 более чем 6 мкг/мл (достигаемые в группах IV и SC дозы 1 мг/кг, и SC дозы 3 мг/кг) согласованно приводили к более, чем 50% ингибированию MASP-2. Эти данные позволяют предполагать, что для OMS858 при уровнях дозы 1 мг/кг и выше согласованно достигали существенного ингибирования активности MASP-2 у мышей на протяжении длительного периода времени.

Самцам яванских макаков (n=3/группу) вводили 0,1, 0,3, 1, или 3 мг/кг OMS858 посредством подкожной (SC) инъекции, или 1 мг/кг посредством внутривенной (IV) инъекции. Образцы сыворотки для определения концентрации OMS858 и фармакодинамической активности OMS858 собирали до дозирования и через 0,083, 1, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848 и 2016 часов после дозирования.

Результаты для обезьян показаны на ФИГУРЕ 21. Приблизительно 70-80% ингибирование активности лектинового пути, начинающееся через 24 час - 48 час после введения OMS858 и продолжающееся в течение приблизительно 336 час после дозирования, наблюдали у яванских макаков, подвергнутых введению OMS858 при 1 мг/кг SC, с последующим постепенным снижением ингибирования с течением времени. Почти полное (>95%) ингибирование активности лектинового пути, начинающееся через ~ 24 час после введения OMS858 и продолжающееся в течение приблизительно 672 час после дозирования, с последующим постепенным снижением ингибирования с течением

времени, наблюдали у яванских макаков, подвергнутых введению 3 мг/кг OMS858 SC. Почти полное ингибирование активности лектинового пути наблюдали также после IV введения OMS858 при 1мг/кг, со сходной длительностью максимального эффекта и постепенным снижением с течением времени, как наблюдали при 1 мг/кг SC.

Присутствовала согласованная взаимосвязь между концентрациями OMS858 в сыворотке и PD активностью у яванских макаков, так что концентрации в сыворотке OMS858 выше приблизительно 20 мкг/мл приводили к высокой степени (> 80%) ингибирования активности лектинового пути, в то время как концентрации в сыворотке ниже приблизительно 3 мкг/мл приводили к минимальному ингибированию. Моделирование концентрации в сыворотке OMS858 и данных PD ответа показало сигмоидный профиль зависимости ответа от концентрации лекарственного средства с значением EC_{50} (концентрации OMS858, приводящей к половине максимального ингибирования лектинового пути) приблизительно 9 мкг/мл. См. ФИГУРУ 22.

Пример 17

Фармакокинетика OMS858 у мыши и яванского макака

PK OMS858 после однократного SC введения 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, или однократного IV болюсного введения 1 мг/кг, характеризовали у самцов мышей CD-1 и у самцов яванских макаков. Образцы крови собирали до дозирования и через 0,083 (только IV), 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176 и 1344 часов после дозирования у мышей (N=3/группу/временную точку; терминальный сбор образцов), так же как до дозирования и через приблизительно 0,083, 1, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848 и 2016 часов после дозирования у обезьян. (N=3/группу/временную точку; серийный сбор образцов).

Обобщение PK параметров, измеренных после однократного введения OMS858 посредством SC или IV инъекции мышам и обезьянам, показано в ТАБЛИЦЕ 23. Графики средней концентрации в сыворотке OMS858 с течением времени после однократного IV или SC введения мышам (левая панель) и обезьянам (правая панель) показаны на ФИГУРЕ 23.

После однократного SC введения, медианное время, за которое достигали максимальной концентрации (t_{\max}), составляло 24-168 часов после дозирования у мышей и 72 или 168 часов после дозирования у обезьян. После однократного SC или IV введения, $t_{1/2}$ выведения OMS858 составляло 203-409 часов у мышей и 196-487 часов у обезьян. Максимальная наблюдаемая концентрация (C_{\max}) и общее воздействие (площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированная до бесконечности [AUC_{INF}]), как правило, увеличивались с увеличением дозы пропорциональным дозе образом у мышей и у обезьян. Биодоступность, определенная с использованием общего воздействия (AUC_{INF}) после однократного SC введения 1 мг/кг OMS858, составляла 85,7% у мышей и 93,0% у обезьян.

ТАБЛИЦА 23: Фармакокинетические параметры после однократного введения OMS858 посредством SC и IV инъекции мышам и обезьянам

Вид	Параметр	0,1мг/кг SC	0,3 мг/кг SC	1,0 мг/кг SC	3,0 мг/кг SC	1 мг/кг IV
Мышь ^a	C_0 (мкг/мл) ^b	NA	NA	NA	NA	24,3
	$t_{\text{макс}}$ (час)	24,0	168	72,0	72,0	0,0830
	$C_{\text{макс}}$ (мкг/мл)	1,19	2,54	8,54	23,1	24,3
	$C_{\text{макс}}/\text{дозу}$ (мкг/мл)/(мг/кг)	11,9	8,47	8,54	7,71	24,3
	$AUC_{(0-336 \text{ час})}$ (час*мкг/мл)	282	716	2170	6040	2570
	$AUC_{(0-336 \text{ час})}/\text{дозу}$ (час*мкг/мл)/(мг/кг)	2820	2390	2170	2010	2570
	$t_{\text{посл}}$ (час)	1340	1340	1340	1340	1340
	$AUC_{(0-t)}$ (час*мкг/мл)	519	1220	4540	14100	5300
	AUC_{INF} (час*мкг/мл)	526	1230	4810	16000	5610
	$t_{1/2}$ (час)	197	167	291	409	296
	CL (мл/час/кг) ^b	NA	NA	NA	NA	0,178
	V_{ss} (мл/кг) ^b	NA	NA	NA	NA	89,6
Биодоступность ^c	NA	NA	85,7%	NA	NA	
Обезьяна ^d	C_0 (мкг/мл) ^b	NA	NA	NA	NA	35,8
	$t_{\text{макс}}$ (час)	160	192	168	104	8,06
	$C_{\text{макс}}$ (мкг/мл)	1,53	6,01	17,9	54	37,2
	$C_{\text{макс}}/\text{дозу}$ (мкг/мл)/(мг/кг)	15,3	20	17,9	18,0	37,2
	$AUC_{(0-336 \text{ час})}$ (час*мкг/мл)	426	1630	4960	16000	6030
	$AUC_{(0-336 \text{ час})}/\text{дозу}$ (час*мкг/мл)/(мг/кг)	4260	5440	4960	5320	6030

Вид	Параметр	0,1 мг/кг SC	0,3 мг/кг SC	1,0 мг/кг SC	3,0 мг/кг SC	1 мг/кг IV
	$t_{\text{посл}}$ (час)	1620	1290	1060	2016	1620
	$AUC_{(0-t)}$ (час*мкг/мл)	1020	3100	9950	44300	11200
	AUC_{INF} (час*мкг/мл)	1080	3160	10600	47800	11400
	$t_{1/2}$ (час)	343	196	225	487	259
	CL (мл/час/кг) ^b	NA	NA	NA	NA	0,0996
	V_z (мл/кг) ^b	NA	NA	NA	NA	29,3
	V_{ss} (мл/кг) ^b	NA	NA	NA	NA	36,7
	Биодоступность ^c	NA	NA	93,0%	NA	NA

а Параметры сыворотки, зарегистрированные для самцов мышей, на основании сводных данных средней концентрации против времени.

б Определено только для IV группы при уровне дозы 1 мг/кг.

с Биодоступность= $AUC_{\text{INF SC}}/AUC_{\text{INF IV}}$.

д Средние параметры сыворотки, зарегистрированные для самцов обезьян.

$AUC_{(0-336 \text{ час})}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до 336 часов после дозирования; $AUC_{(0-336 \text{ час})}/\text{дозу}$ =нормализованная по дозе площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до 336 часов после дозирования; $AUC_{(0-t)}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до t часов (последней измеренной временной точки); AUC_{INF} =площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированная до бесконечности; C_0 =оцененная концентрация на время 0; $C_{\text{макс}}$ =максимальная наблюдаемая концентрация; $C_{\text{макс}}/\text{дозу}$ =нормализованная по дозе максимальная наблюдаемая концентрация; h=час(ы); NA=неприменимо; SC=подкожный; IV=внутривенный; $t_{1/2}$ =терминальное время полужизни; $t_{\text{посл}}$ =последняя поддающаяся измерению временная точка; $t_{\text{макс}}$ =время, при котором достигнута максимальная концентрация; V_{ss} =объем распределения в состоянии равновесия; V_z =объем распределения, на основании фазы терминального выведения

Пример 18

Клиническое исследование однократной дозы OMS858 фазы 1 у здоровых субъектов-людей

Слепое исследование однократной нарастающей дозы для внутривенного (IV) и подкожного (SC) введения OMS858 у здоровых субъектов проводят для оценки безопасности, переносимости, PK, PD и иммуногенности, по сравнению с плацебо. Всего 48 здоровых добровольцев-людей разделяют на 6 когорт из 8 субъектов каждая. В каждой

когорте, 6 субъектам вводят OMS858 и 2 субъектам вводят плацебо. Как субъекты, так и медицинский персонал, вводящий дозы, являются неосведомленными, в отношении того, каким субъектам вводят OMS858, и каким вводят плацебо. Дозирование для 6 когорт является следующим:

- Когорта 1: однократная IV доза 0,01 мг/кг OMS858 или плацебо
- Когорта 2: однократная IV доза 0,03 мг/кг OMS858 или плацебо
- Когорта 3: однократная IV доза 0,1 мг/кг OMS858 или плацебо
- Когорта 4: однократная IV доза 0,3 мг/кг OMS858 или плацебо
- Когорта 5: однократная SC доза 1,0 мг/кг OMS858 или плацебо
- Когорта 6: однократная SC доза OMS858 или плацебо, дозировку следует

определять на основании данных для более ранних когорт

Субъекты представляют собой здоровых людей мужского или женского пола в возрасте 18-60 лет, имеющих массу 50-110 кг и индекс массы тела 18-30 кг/м² на время скрининга. Образцы крови отбирают при скрининге, на сутки -1 до введения, непосредственно перед дозированием, через 0,5, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 часов после введения, и на сутки 15, 22, 29, 57 и 85 после введения. Первичные конечные точки представляют собой оценку безопасности и переносимости OMS858. Вторичные конечные точки представляют собой характеристику PK и PD OMS858, и оценку присутствия антител против лекарственного средства (ADA) против OMS858 после введения. Поисковая конечная точка представляет собой анализ влияния OMS858 на уровни MASP-2 и связывающего маннан лектина (MBL).

Оценки безопасности и переносимости включают мониторинг неблагоприятных событий, показатели жизненно важных функций, электрокардиограмму, физическое обследование, тестирование образцов крови и мочи для клинических оценок, и другие измерения клинического статуса. Образцы крови и/или сыворотки от субъектов оценивают для анализа PK, анализа PD, как определено посредством ингибирования лектинового пути как измерено посредством анализа накопления C4, уровней MASP-2, уровней MBL, ADA и других значимых биомаркеров.

Промежуточные данные PK и PD для когорты 1, когорты 2, когорты 3 и когорты 4 показаны на ФИГУРАХ 25-26. Не наблюдали проблем безопасности или переносимости на протяжении временных точек, показанных на ФИГУРАХ 25-26. PK измерения для OMS858 показали пропорциональное дозе воздействие на протяжении временных точек, показанных на ФИГУРЕ 25. Сильные и длительные PD ответы для OMS858 наблюдали во всех трех когортах, как показано на ФИГУРЕ 26. Наблюдали обеспечивающую преимущества взаимосвязь PK/PD, как показано на ФИГУРЕ 27, с EC₅₀ 170 нг/мл и EC₉₀ 400 нг/мл, на основании данных для когорт 1-3.

IX. Иллюстративные варианты осуществления

Содержание всех публикаций, патентных заявок и патентов, упомянутых в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В то время как конкретные варианты осуществления настоящего изобретения проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что в них можно вносить различные изменения без отклонения от содержания и объема настоящего изобретения. Несмотря на то, что настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что изобретение, как заявлено в формуле изобретения, не должно быть необоснованно ограничено такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации описанных вариантов осуществления изобретения, очевидные специалисту в областях медицины, иммунологии, фармакологии или родственных областях, предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

Соответственно, следующие пронумерованные параграфы, описывающие конкретные варианты осуществления, представлены для ясности, но их не следует рассматривать как ограничивающие пункты формулы изобретения.

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с эпитопом, локализованным внутри домена сериновой протеазы MASP-2 человека, где указанный эпитоп расположен в пределах аминокислот ${}_{496}\text{DIRMGTLKRLSPHYTQAW}_{513}$ (SEQ ID NO:6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует лектиновый путь активации комплемента.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с C4 за связывание с MASP-2.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует водородную связь по меньшей мере с одним из Lys 503 и/или His 508 MASP-2 человека.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует водородную связь с His 508 MASP-2 человека.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует контакт Ван-дер-Ваальса с одной или несколькими из следующих аминокислот MASP-2 человека: Asp 496, Lys 503, Ser 506, Pro 507, His 508 и Trp 513.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1 с последовательностью NXXMH, где X в положении 2 представляет собой H или Y, и где X в положении 3 представляет собой H или W; HC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:63 (DIDXSDSEXXYXXKFKD), где X в положении 4 представляет собой P или A; и где X в положении 9 представляет собой T или I, и где X в положении 10 представляет собой H или Y, и где X в положении 12 представляет собой I или N; и где X в положении 13 представляет собой E или Q; и HC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:18

(GDITTTLLRYFDV); и (b) переменную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:64 (SASSSVXYMY), где X в положении 7 представляет собой R или S; LC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT); или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:25 (SYWMH), HC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:27 (NINPSNGGTNCNEKFKN), и HC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:29 (WAYDAMDY), и LC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:41 (RASESVDSYGNSFMH), LC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:43 (FASNLES), и LC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:45 (QQSNEDPLT).

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH).

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH).

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 57 (NHHMH).

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD).

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD).

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID Δ SDSETHYIEKFKD).

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY).

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY).

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH); SEQ ID NO:56 (NYHMH) или SEQ ID NO:57 (NHHMH), HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DID Δ SDSETHYIEKFKD), HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DID Δ SDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16

(DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57 (NHHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57 (NHHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 ((DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

24. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и легкую

цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:47.

25. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:47.

26. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:8, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:11.

27. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 6(b), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:9, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:12.

28. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышиного антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и полноразмерного антитела.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, дополнительно содержащие константную область иммуноглобулина.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой иммуноглобулин IgG, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в области Fc.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 33, где область Fc содержит аминокислотную замену S228P.

35. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом сериновой протеазы MASP-2 человека с аффинностью менее чем 20 нМ.

36. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом сериновой протеазы MASP-2 человека с аффинностью менее чем 10 нМ.

37. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует лектиновый путь в крови млекопитающего.

38. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления C3b в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

39. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления C4 в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из параграфа 37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления MAC в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

41. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не ингибирует классический путь в крови млекопитающего.

42. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из параграфов 1-34 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

43. Композиция из параграфа 42, где указанная композиция сформулирована для подкожного введения.

44. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелых и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34.

45. Комбинация выделенного полинуклеотида, кодирующего переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34, и выделенного полинуклеотида, кодирующего переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34.

46. Клонированный вектор или экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид из параграфа 44 или комбинацию полинуклеотидов из параграфа 45.

47. Комбинация клонирующего вектора или экспрессирующего вектора, содержащего выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34, и клонирующего вектора или экспрессирующего вектора, содержащего выделенный

полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34.

48. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько клонирующих векторов или экспрессирующих векторов из параграфов 46 или 47.

49. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из параграфов 1-34, включающий культивирование клетки-хозяина по параграфу 48 и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

50. Способ ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего, включающий введение млекопитающему количества композиции по параграфу 42, содержащего достаточно высокоаффинного ингибирующего антитела против MASP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента для ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего.

51. Способ из параграфа 50, где млекопитающее страдает от или подвержен риску развития связанного с лектиновым путем заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из: тромботической микроангиопатии (ТМА), почечного нарушения, воспалительной реакции, возникающей в результате трансплантации ткани или органа, ишемически-реперфузионного повреждения, осложнения, ассоциированного с диабетом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-кишечного нарушения, легочного нарушения, офтальмологического заболевания или нарушения, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, реакции трансплантат против хозяина, веноокклюзионного заболевания и диффузного альвеолярного кровоизлияния.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с эпитопом, расположенным внутри домена сериновой протеазы MASP-2 человека, где указанный эпитоп расположен в пределах аминокислот ${}_{496}\text{DIRMGTLKRLSPHYTQAW}_{513}$ (SEQ ID NO:6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует лектиновый путь активации комплемента.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с C4 за связывание с MASP-2.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует водородную связь по меньшей мере с одним из Lys 503 и/или His 508 MASP-2 человека.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует водородную связь с His 508 MASP-2 человека.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует контакт Ван-дер-Ваальса с одной или несколькими из следующих аминокислот MASP-2 человека: Asp 496, Lys 503, Ser 506, Pro 507, His 508 и Trp 513.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1 с последовательностью NXXMH, где X в положении 2 представляет собой H или Y, и где X в положении 3 представляет собой H или W; HC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:63 (DIDXSDSEXXYXXKFKD), где X в положении 4 представляет собой P или A; и где X в положении 9 представляет собой T или I, и где X в положении 10 представляет собой H или Y, и где X в положении 12 представляет собой I или N; и где X в положении 13 представляет собой E или Q; и HC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:18 (GDITTTLR YFDV); и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую LC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:64 (SASSSVXYMY), где X в положении 7 представляет собой R или S; LC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT); или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:25 (SYWMH), HC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:27 (NINPSNGGTNCNEKFKN), и HC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:29 (WAYDAMDY), и LC-CDR1, указанную как SEQ ID NO:41 (RASESVDSYGNSFMH), LC-CDR2, указанную как SEQ ID NO:43 (FASNLES), и LC-CDR3, указанную как SEQ ID NO:45 (QQSNEDPLT).

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH).

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH).

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO: 57 (NHHMH).

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD).

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD).

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD).

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY).

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY).

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH); SEQ ID NO:56 (NYHMH) или SEQ ID NO:57 (NHHMH), HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57 (NHHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) или SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(а), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-

CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLA), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID Δ SDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLA), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:56 (NYHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 (DID Δ SDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLA), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:57 (NHHMH); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:53 ((DID Δ SDSETHYIEKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLA), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где HC-CDR1 содержит SEQ ID NO:14 (NYWM); HC-CDR2 содержит SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD), и HC-CDR3 содержит SEQ ID NO:18 (GDITTLRYFDV), и LC-CDR1 содержит SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY), LC-CDR2 содержит SEQ ID NO:34 (DTSNLA), и LC-CDR3 содержит SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

24. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:47.

25. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:47.

26. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6(a), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:8, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:11.

27. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6(b), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, являющуюся

по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:9, и легкую цепь, являющуюся по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:12.

28. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, мышинового антитела и антигенсвязывающего фрагмента любого из вышеуказанных.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, ScFv, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, одновалентного антитела, лишённого шарнирной области, и полноразмерного антитела.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, дополнительно содержащие константную область иммуноглобулина.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой иммуноглобулин IgG, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4.

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в области Fc.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.33, где область Fc содержит аминокислотную замену S228P.

35. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом сериновой протеазы MASP-2 человека с аффинностью менее чем 20 нМ.

36. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом сериновой протеазы MASP-2 человека с аффинностью менее чем 10 нМ.

37. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует лектиновый путь в крови млекопитающего.

38. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления C3b в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

39. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления C4 в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.37, где ингибирование лектинового пути включает уменьшение накопления МАС в условиях анализа, специфических для лектинового пути.

41. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не ингибирует классический путь в крови млекопитающего.

42. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

43. Композиция по п.42, где указанная композиция сформулирована для подкожного введения.

44. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелых и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34.

45. Комбинация выделенного полинуклеотида, кодирующего переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34, и выделенного полинуклеотида, кодирующего переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34.

46. Клонированный вектор или экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.44 или комбинацию полинуклеотидов по п.45.

47. Комбинация клонирующего вектора или экспрессирующего вектора, содержащего выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34, и клонирующего вектора или экспрессирующего вектора, содержащего выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34.

48. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько клонирующих векторов или экспрессирующих векторов по п.46 или п.47.

49. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-34, включающий культивирование клетки-хозяина по п.48 и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

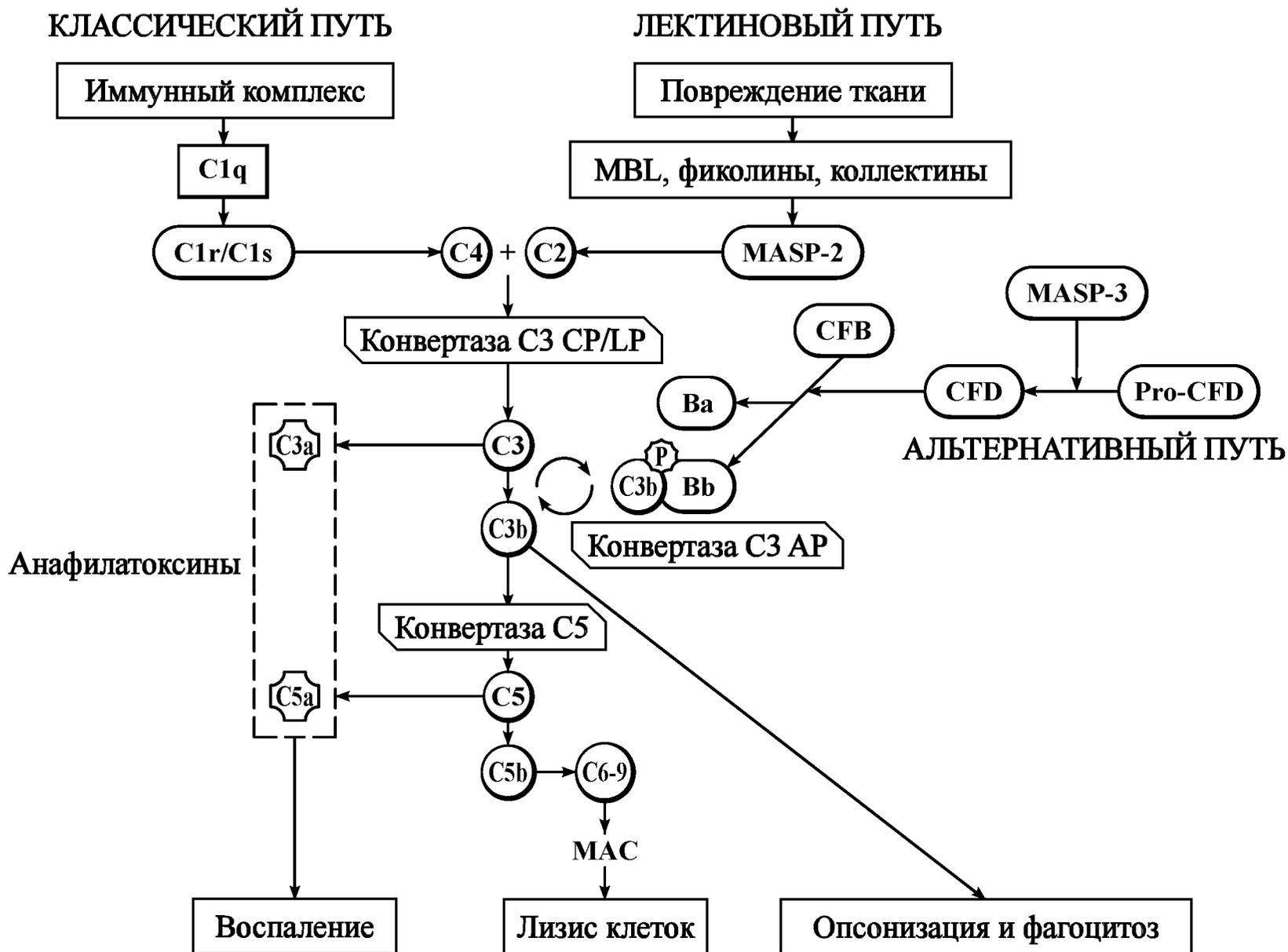
50. Способ ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего, включающий введение млекопитающему количества композиции по п.42, содержащего достаточно высокоаффинного ингибирующего антитела против MASP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента для ингибирования лектинового пути активации комплемента у млекопитающего.

51. Способ по п.50, где млекопитающее страдает от или подвержено риску развития связанного с лектиновым путем заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из: тромботической микроангиопатии (ТМА), почечного нарушения, воспалительной реакции, возникающей в результате трансплантации ткани или органа, ишемически-реперфузионного повреждения, осложнения, ассоциированного с диабетом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-

кишечного нарушения, легочного нарушения, офтальмологического заболевания или нарушения, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, реакции трансплантат против хозяина, веноокклюзионного заболевания и диффузного альвеолярного кровоизлияния.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

MASP-2



ФИГ.3

Варибельные области функциональных мышиных mAb против MASP-2

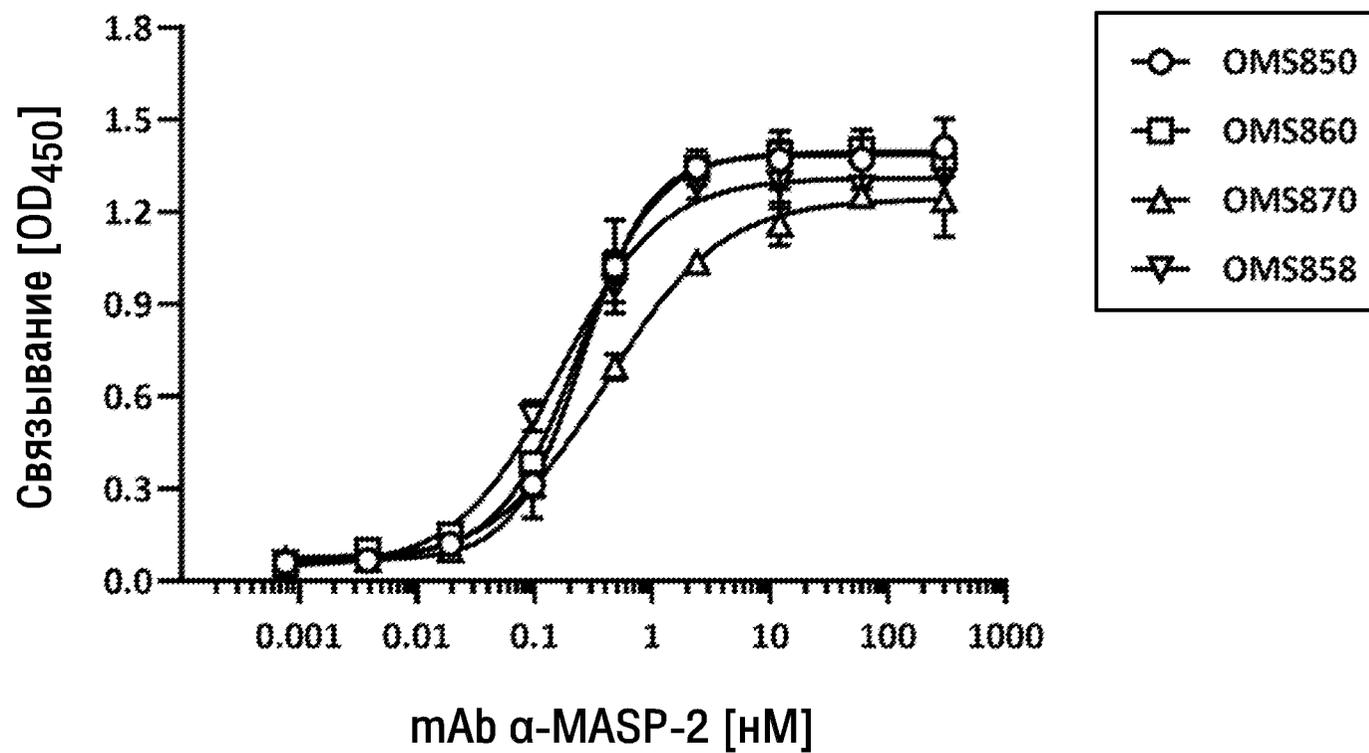
VH

Kabat#	31	35	50	65	95	102						
OMS850_VH	QVQLQQPGAE	LVRPGSSVRL	SCKASGYTFT	<u>NYWMHWL</u> KQR	PIQGLEWIGD	<u>IDPSDSETHY IEKFKD</u> KATL	TIDKSSSTAY	MHLSSLTSED	SAIYYCARGD	<u>ITTTLRYFDV</u>	WGTGTTVTVS	S
OMS860_VH	QVQLQQPGAE	LVRPGSSVRL	SCKASGYTFT	<u>NYWMHWVR</u> QR	PIQGLEWIGD	<u>IDPSDSEIYY NQKFKD</u> KATL	TVDKSSSTAY	MHLSSLTSED	SAVYYCARGD	<u>ITTTLRYFDV</u>	WGTGTTVTVS	S
OMS870_VH	EVQLQQPGTE	LVKPGASVRL	SCKASGYTFT	<u>SYWMHWV</u> KQR	PGQGLEWIGN	<u>INPSNGGTC NEKFKN</u> KATM	TVDKSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARWA	<u>YDA----MDY</u>	WGQGTSTVTS	S

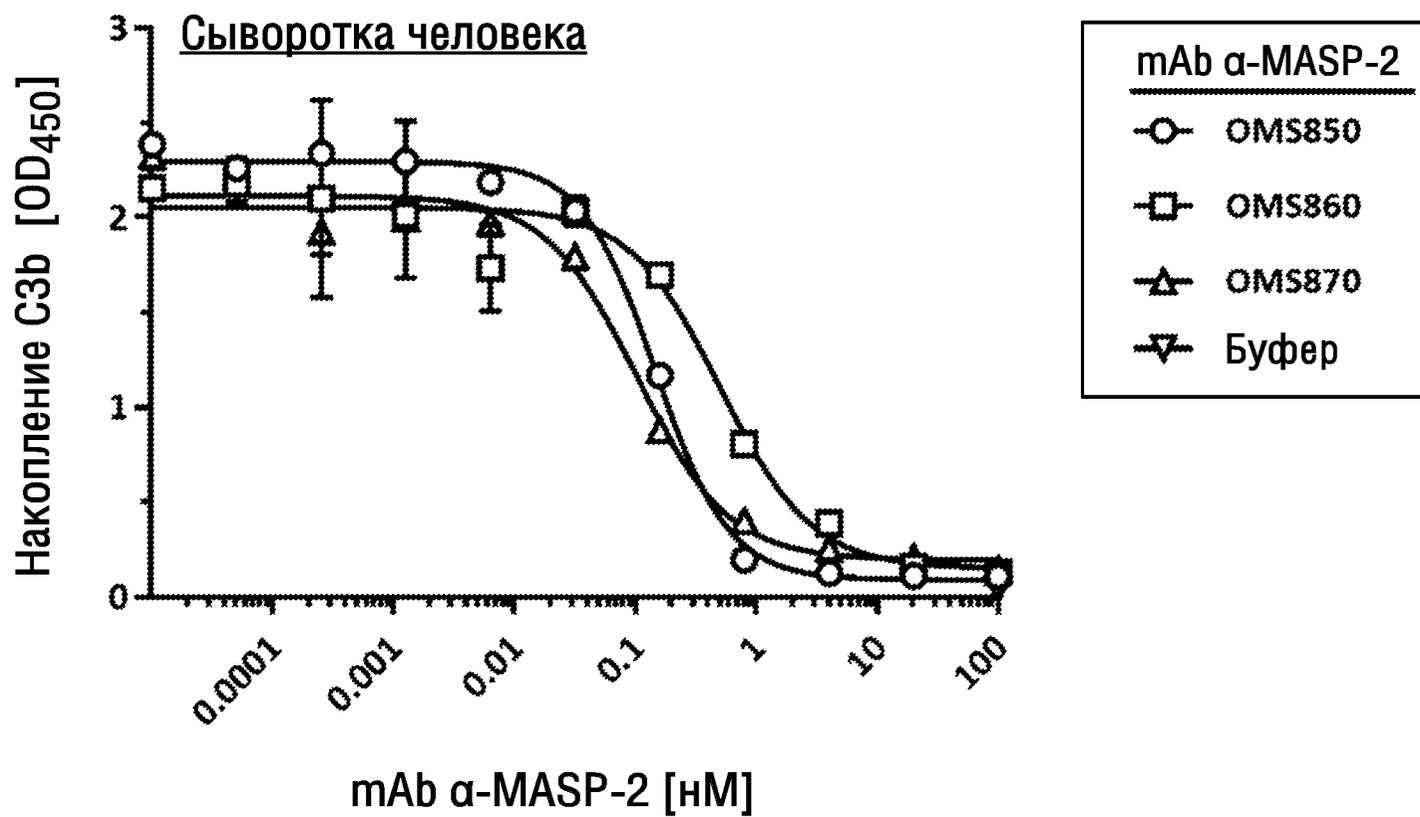
VL

Kabat#	24	34	50	56	89	97						
OMS850_VL	QIVLTQSPVI	MSASPGEKVT	MTC <u>SASSSV-</u>	---- <u>RYMY</u> WY	QQKPGSSPRL	<u>LIYDTSNLAS</u>	GVPVRFSGSG	SGTSNSLTIS	RMEAEDAATY	<u>YCQOWSSYPL</u>	<u>TFGAGTKLEL</u>	KR
OMS860_VL	QIVLTQSPVI	MSASPGEKVT	ITC <u>SASSSV-</u>	---- <u>SYMY</u> WY	QQKPGSSPRL	<u>LIYDTSNLAS</u>	GVPVRFSGSG	SGTSNSLTIS	RMEAEDAATY	<u>YCQOWSSYPL</u>	<u>TFGAGTKLEL</u>	KR
OMS870_VL	DIVLTQSPAS	LAVSLGQRAT	ISCR <u>ASESVD</u>	<u>SYGNSFMHW</u> Y	QQKPGQAPKL	<u>LIYFASNLES</u>	GVPARFSGSG	SRTDFTLTID	PVEADDAATY	<u>FCQOSNEDPL</u>	<u>TFGAGTKLEL</u>	KR

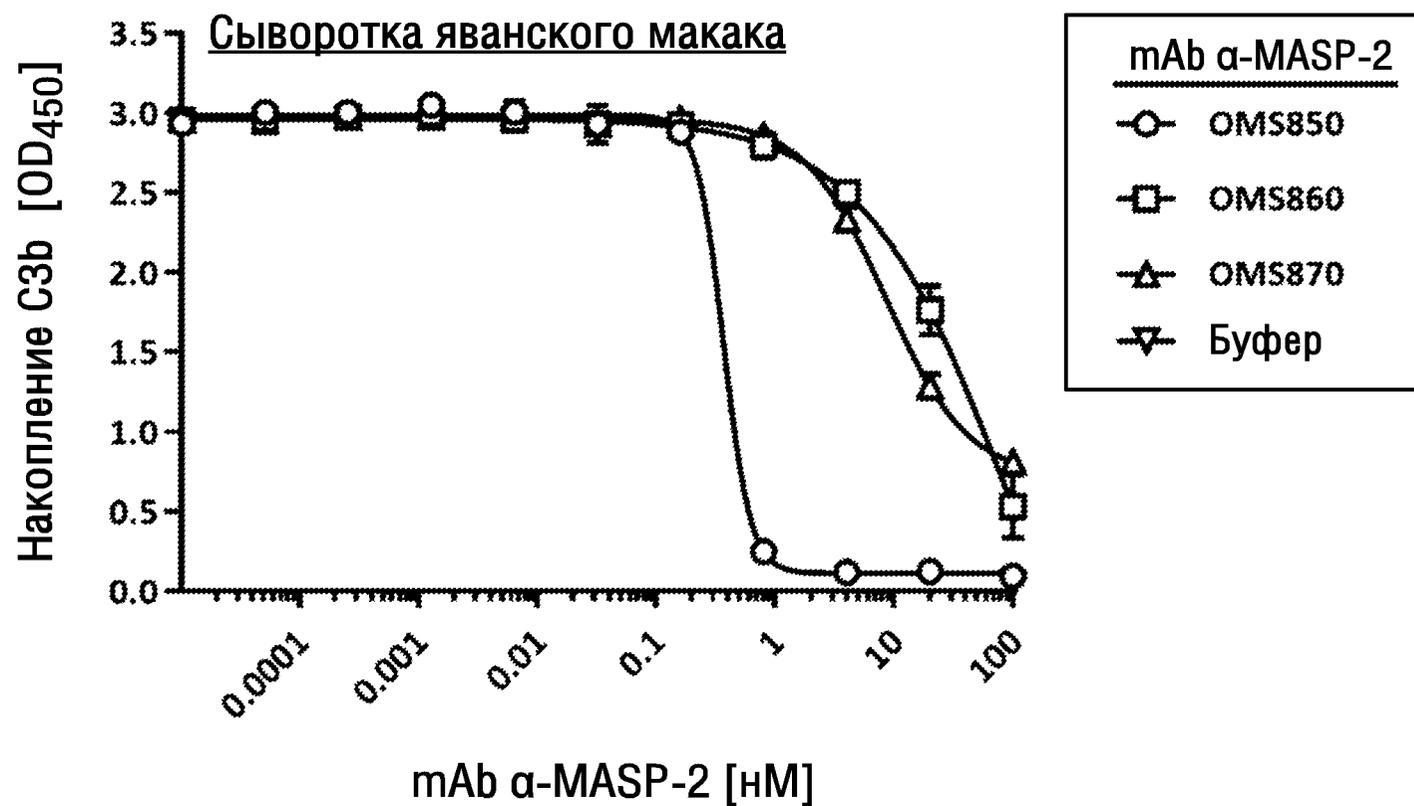
ФИГ.4



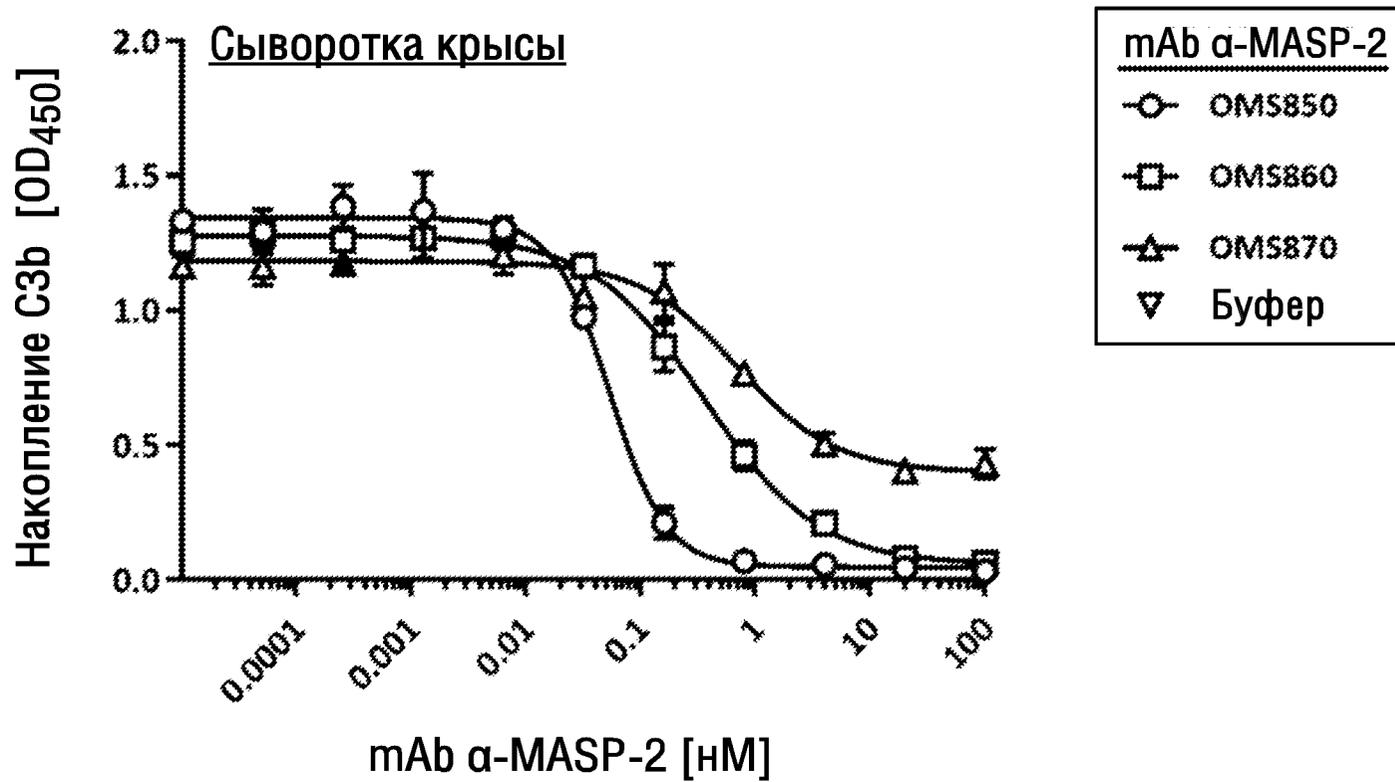
ФИГ.5А



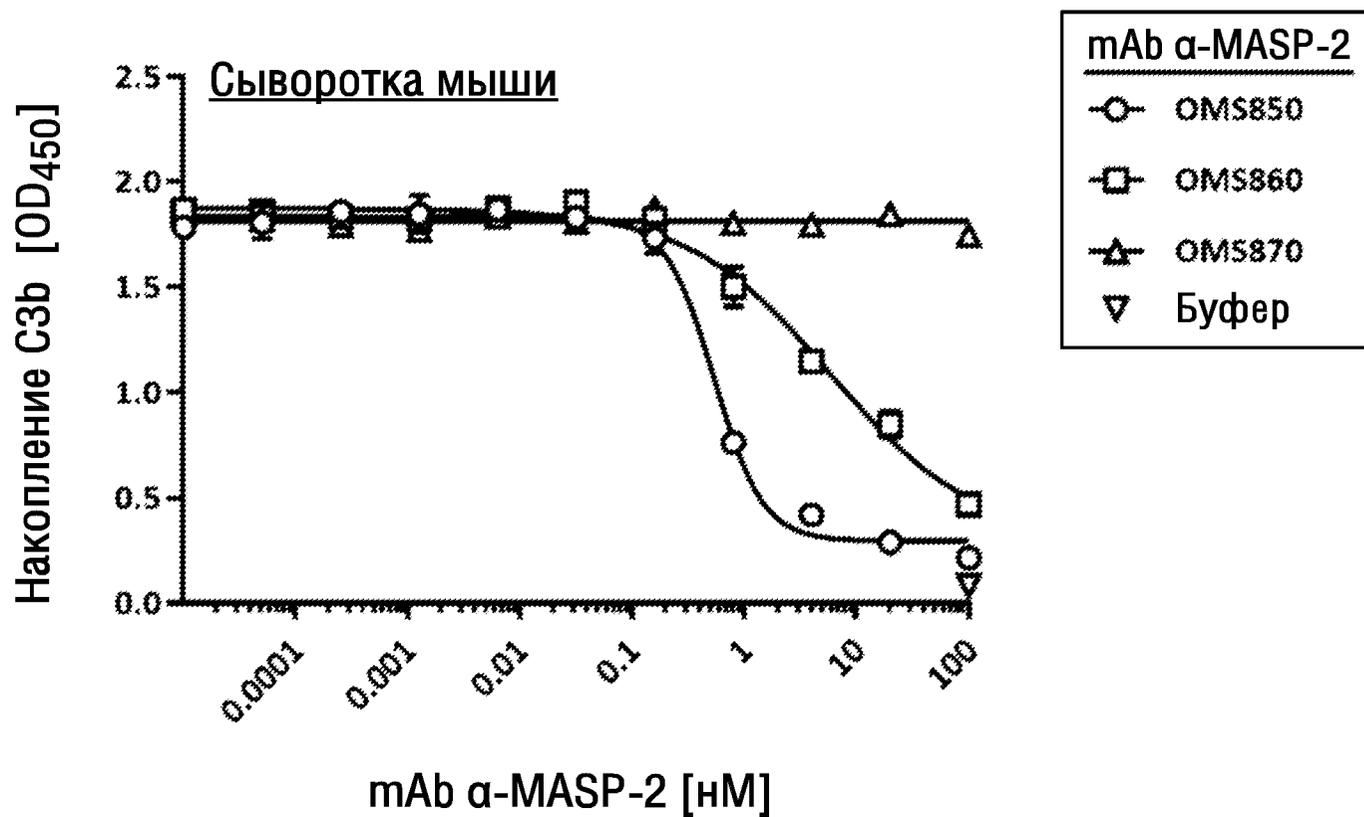
ФИГ.5В



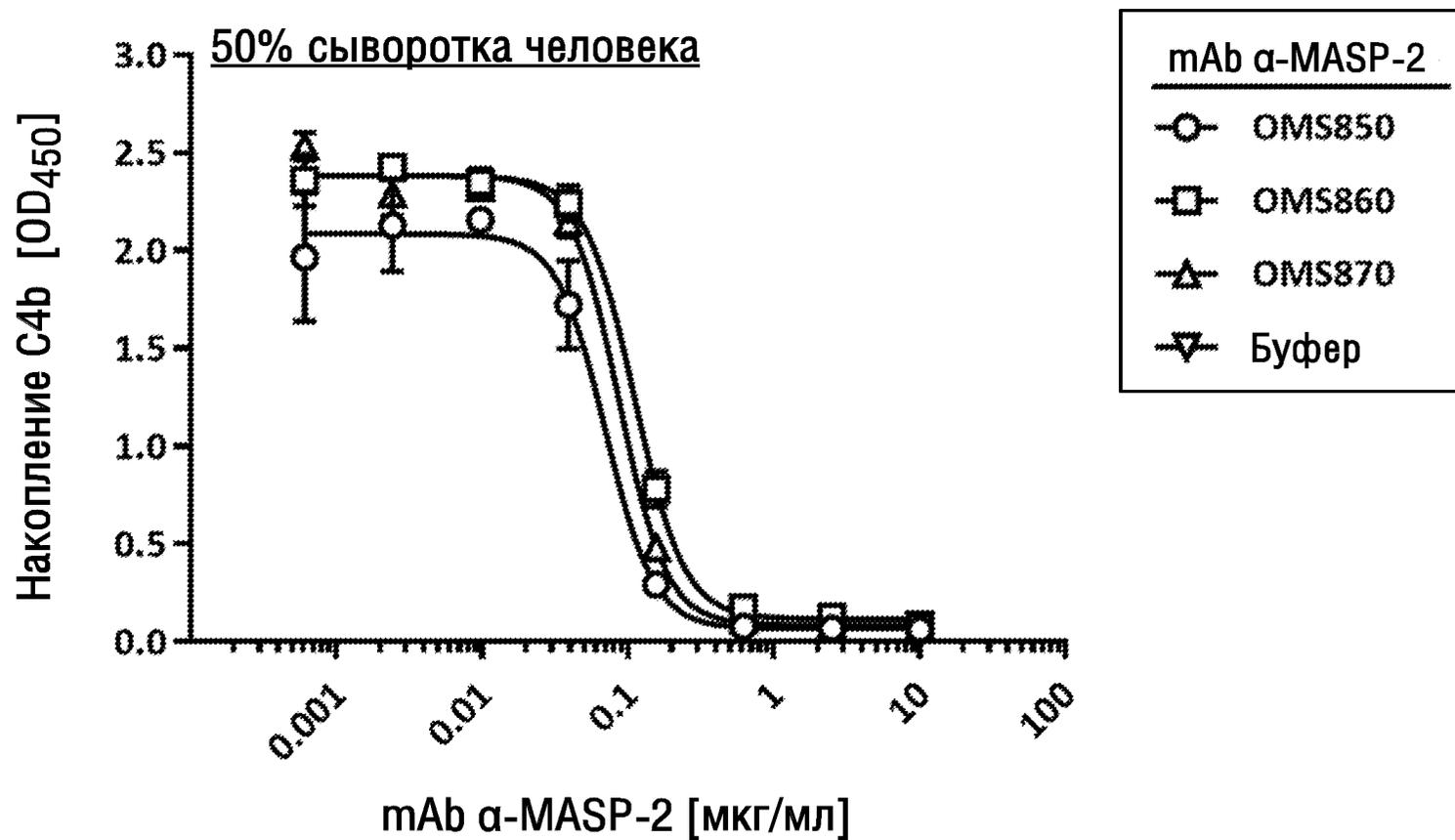
ФИГ.5С



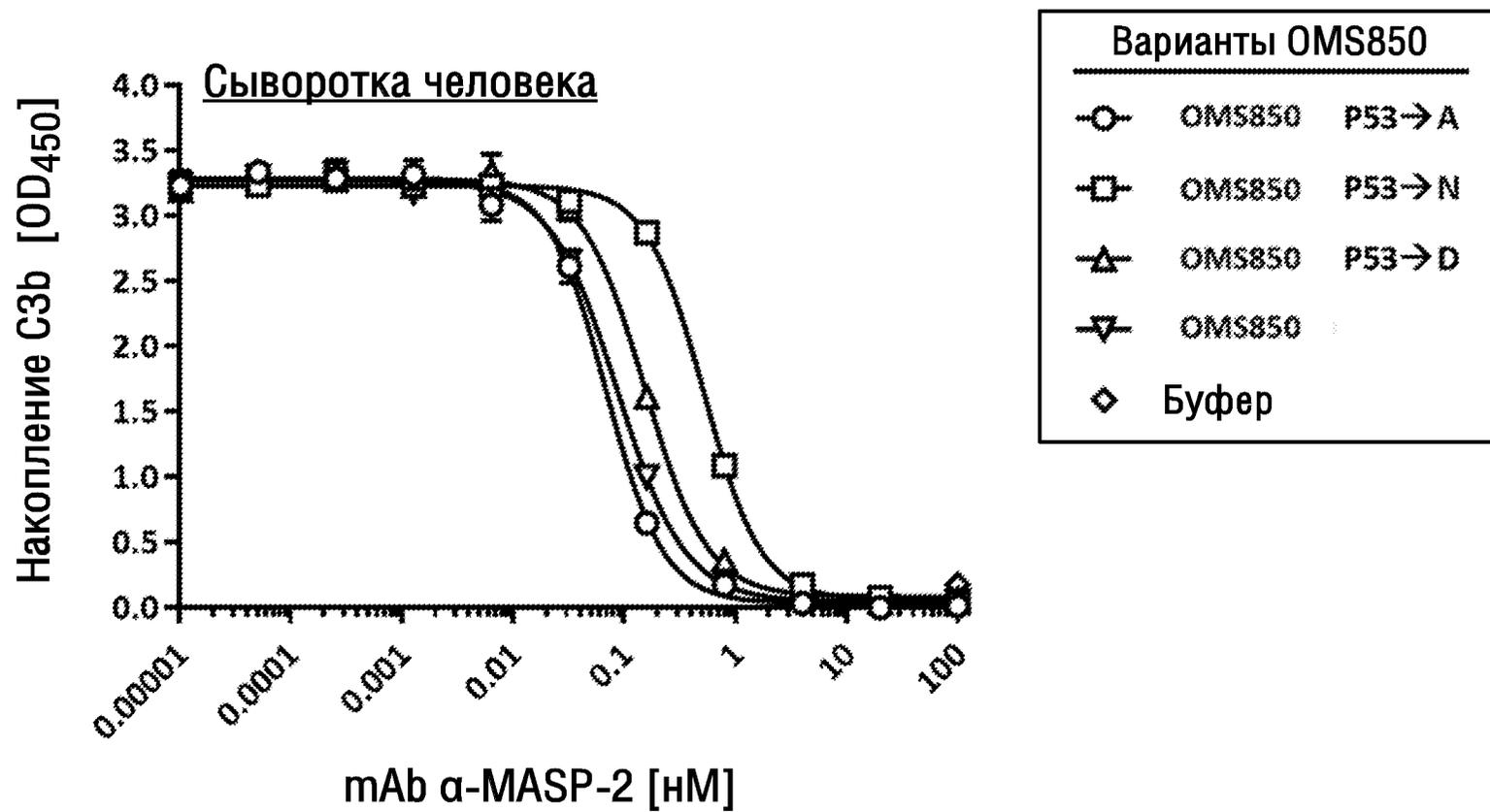
ФИГ.5D



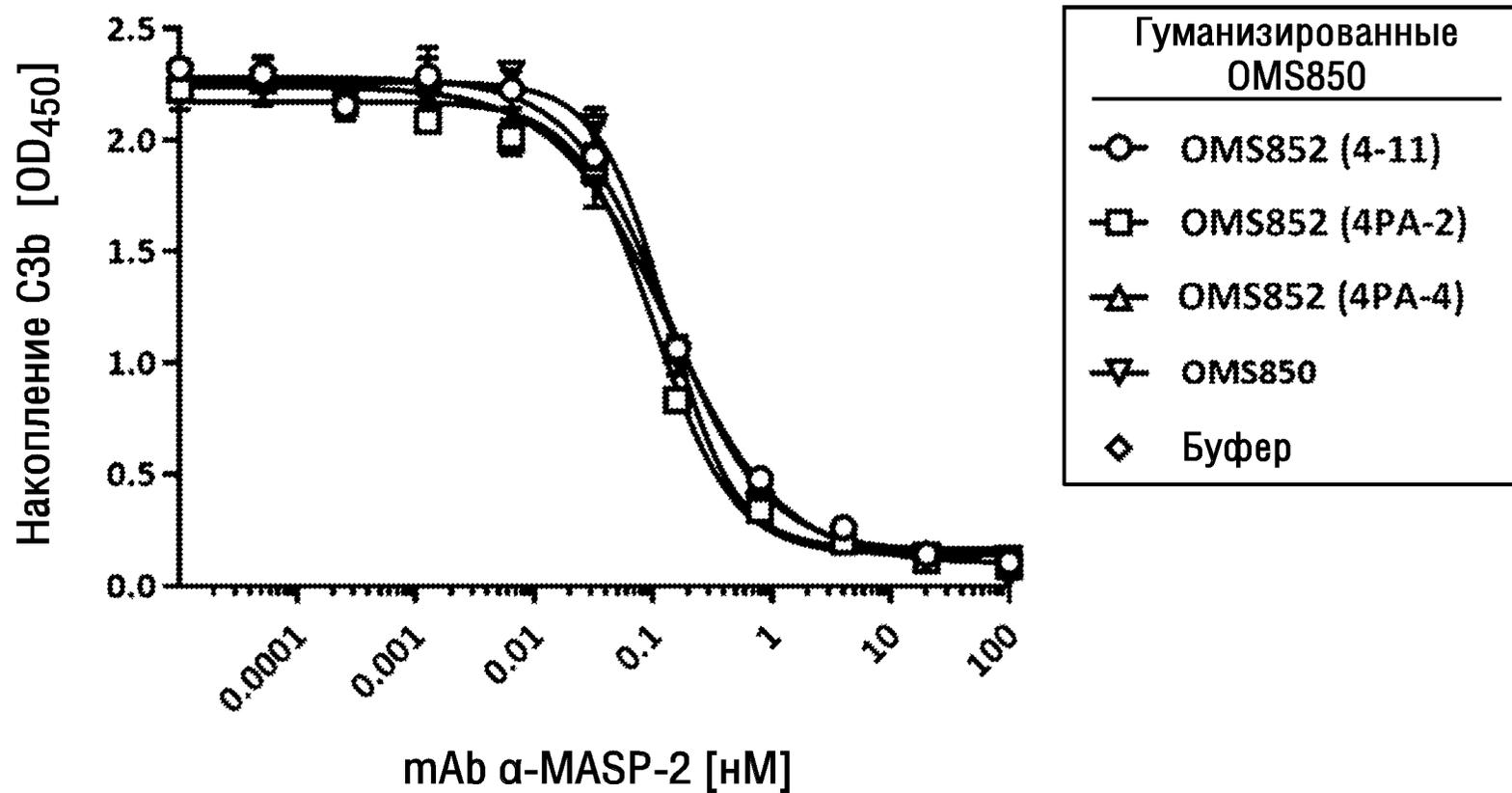
ФИГ.6



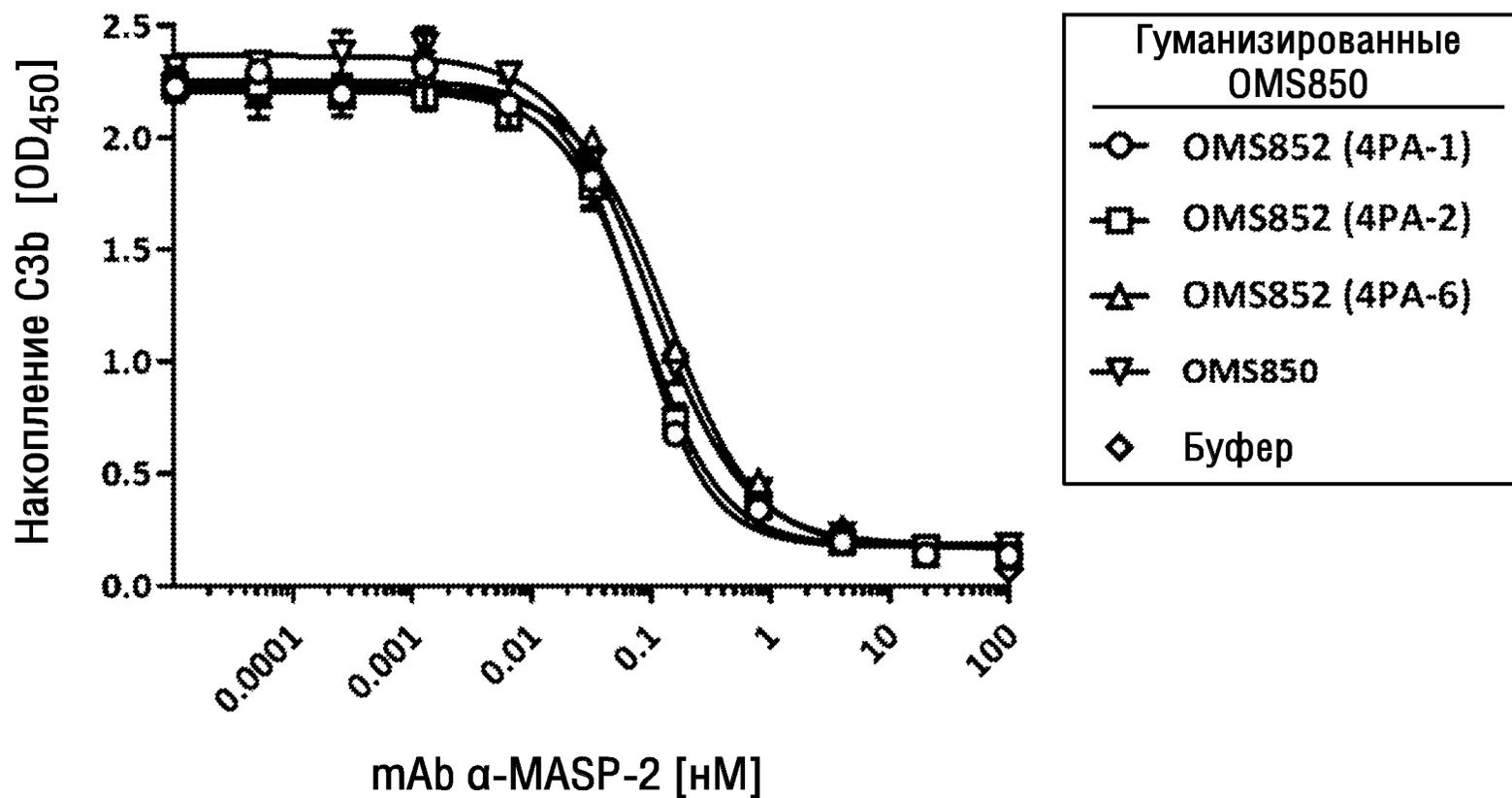
ФИГ.27



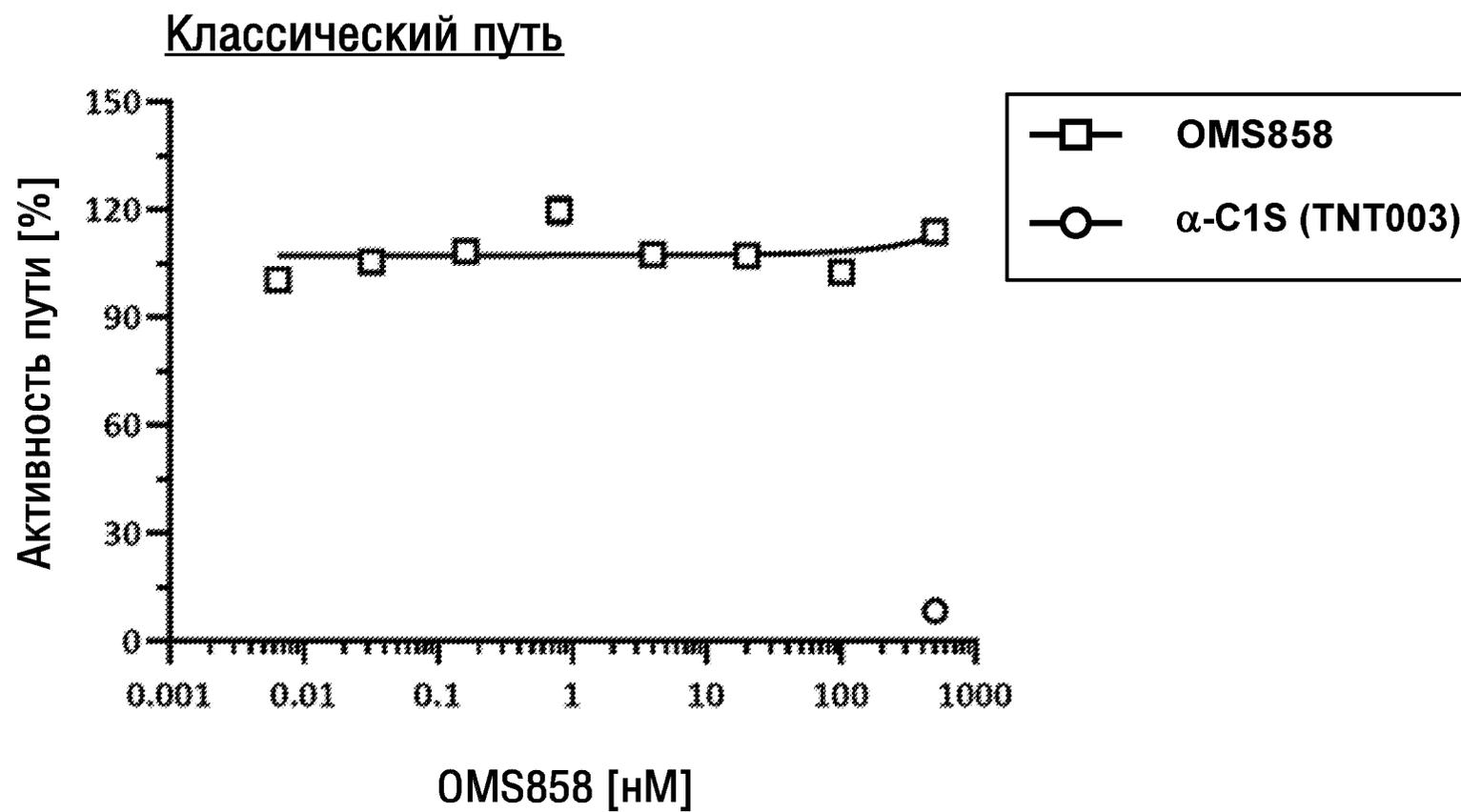
ФИГ.8А



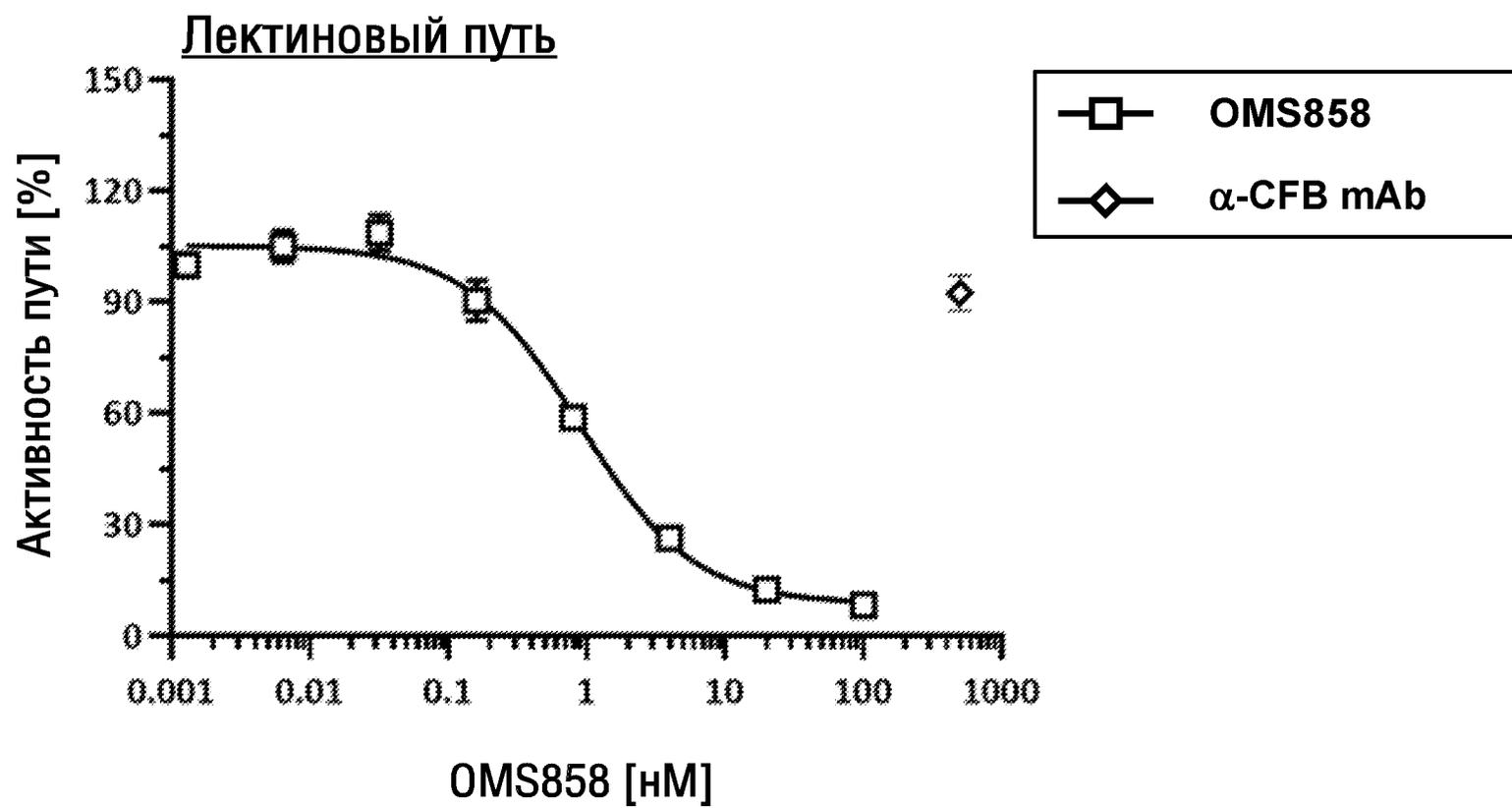
ФИГ.8В



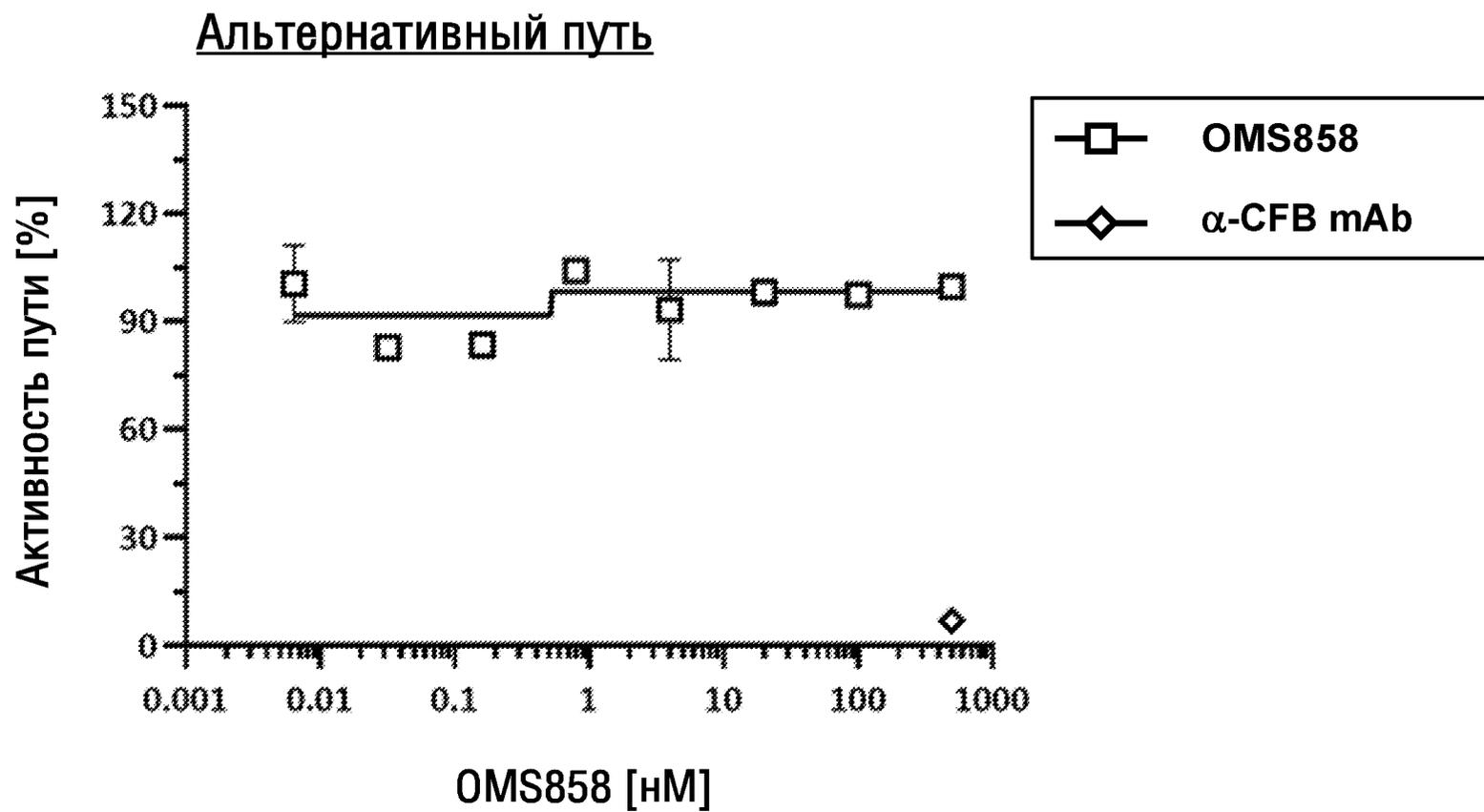
ФИГ.9А



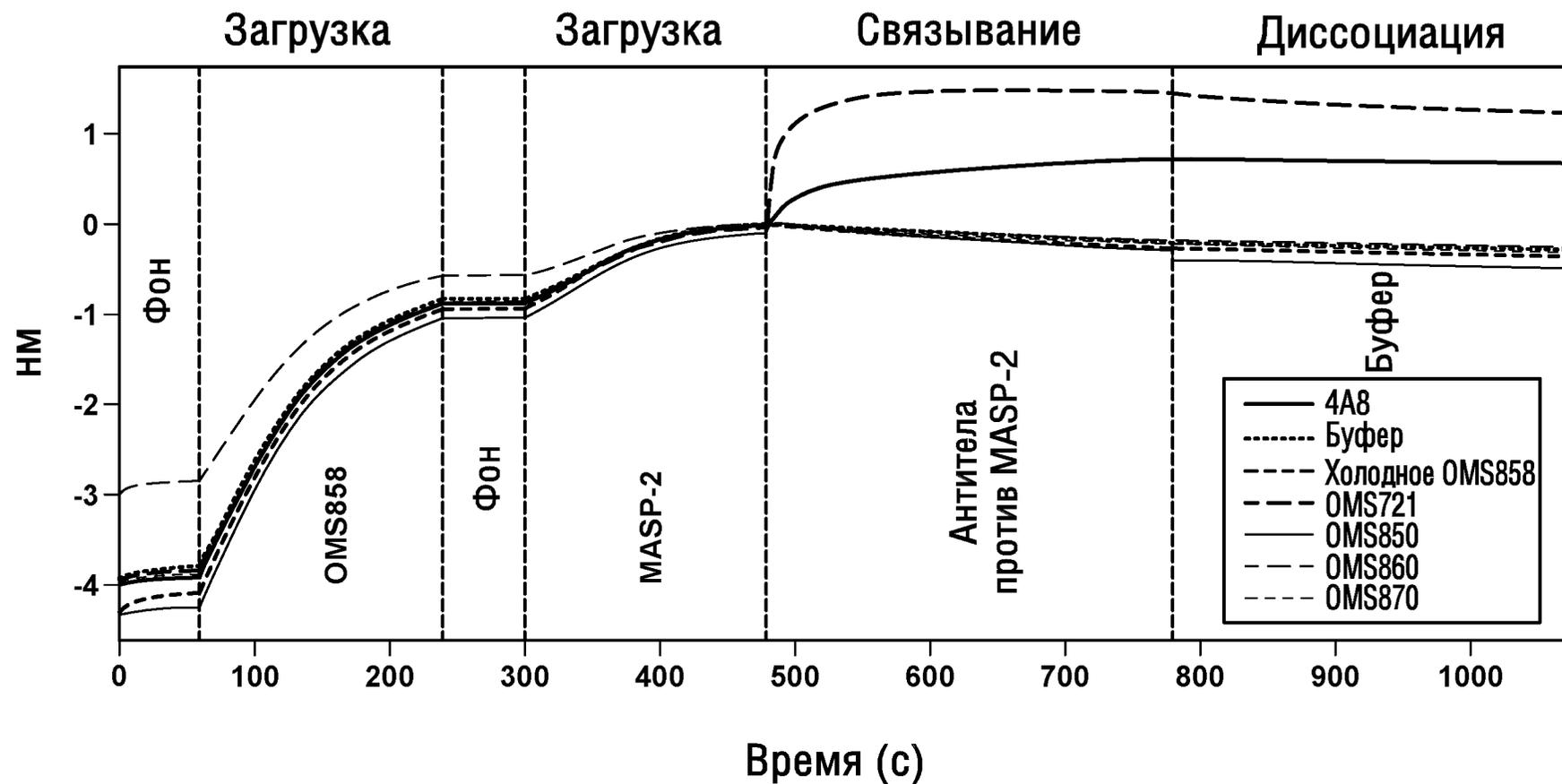
ФИГ.9В



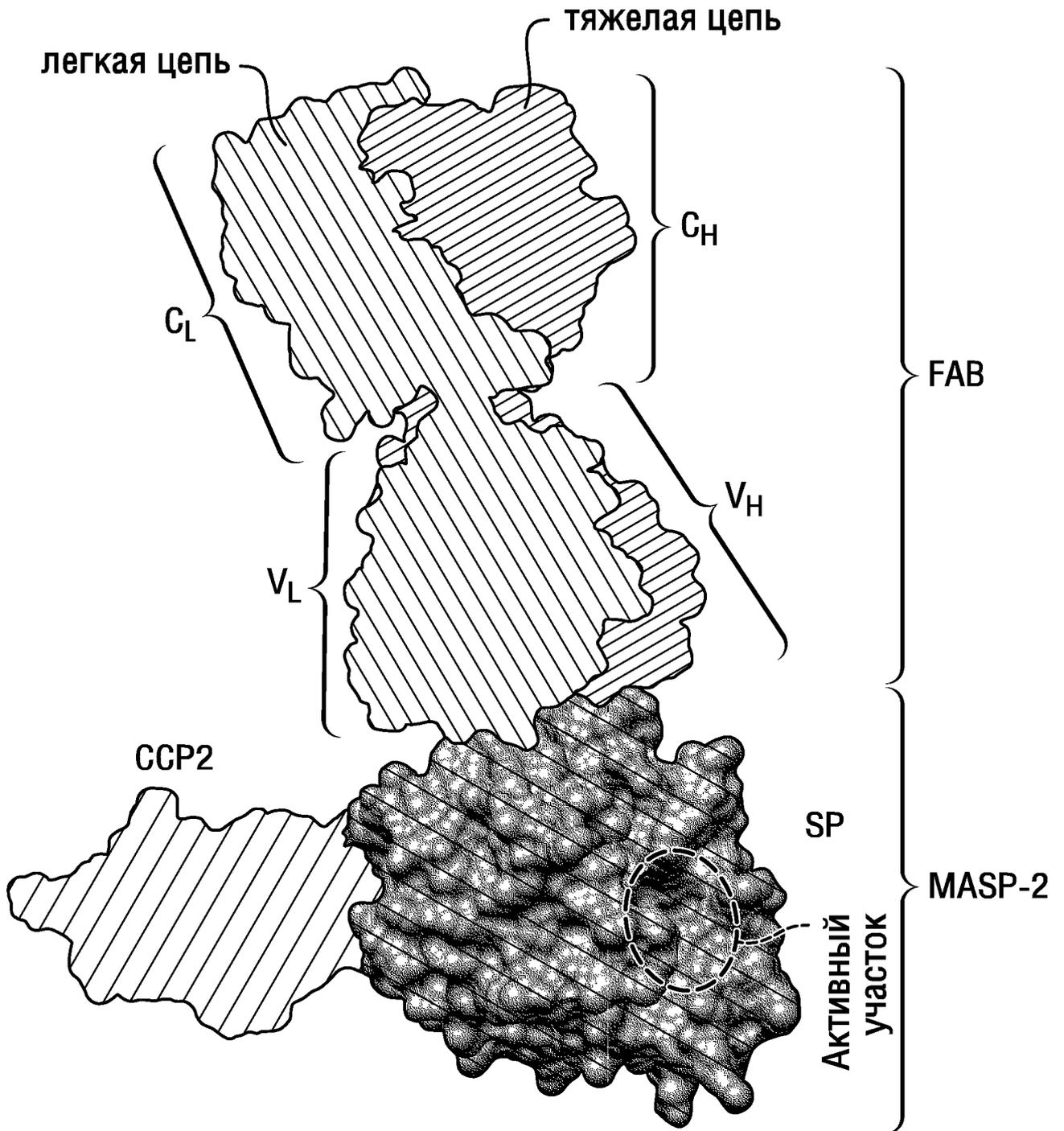
ФИГ.9С



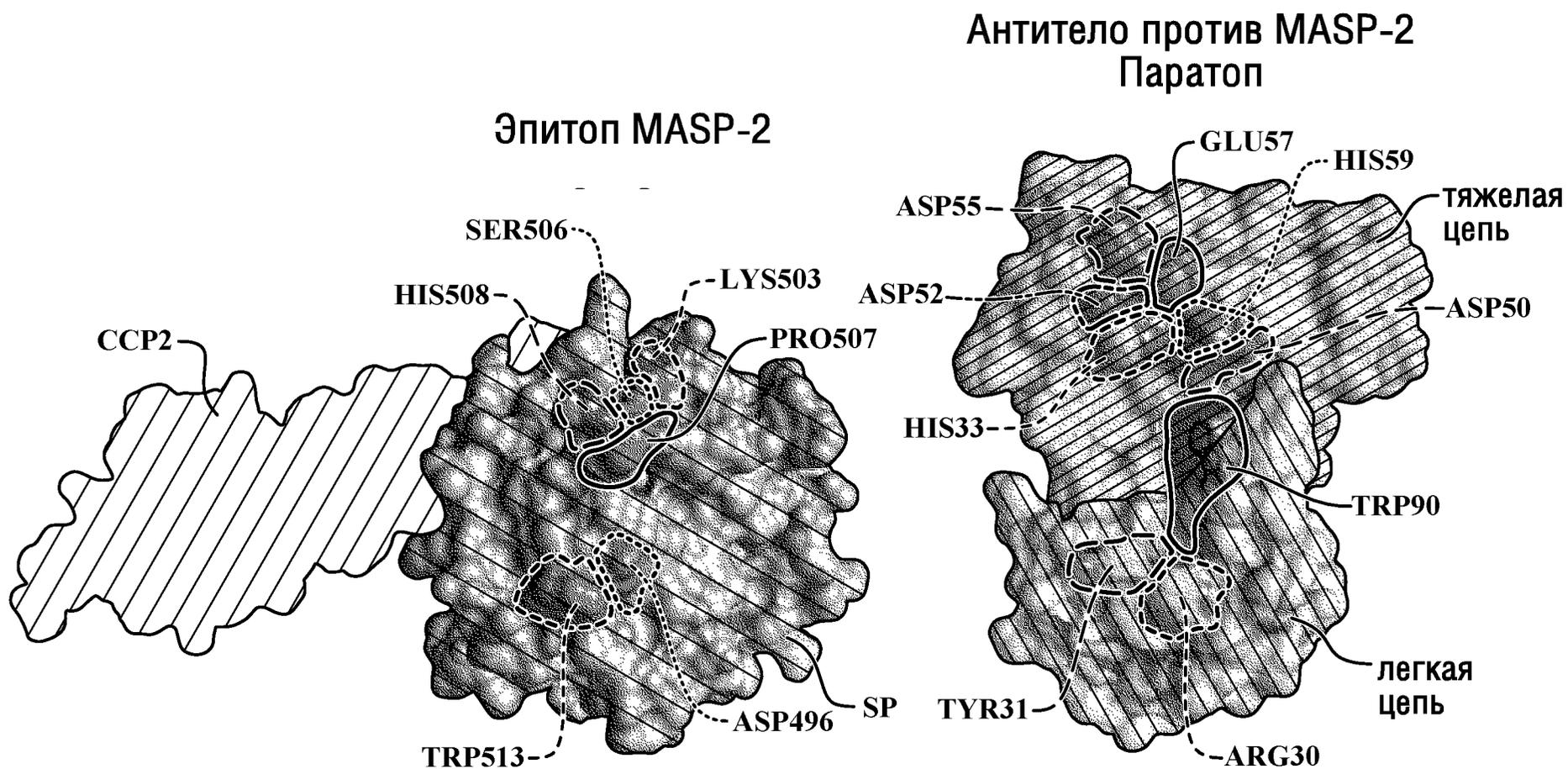
ФИГ.10



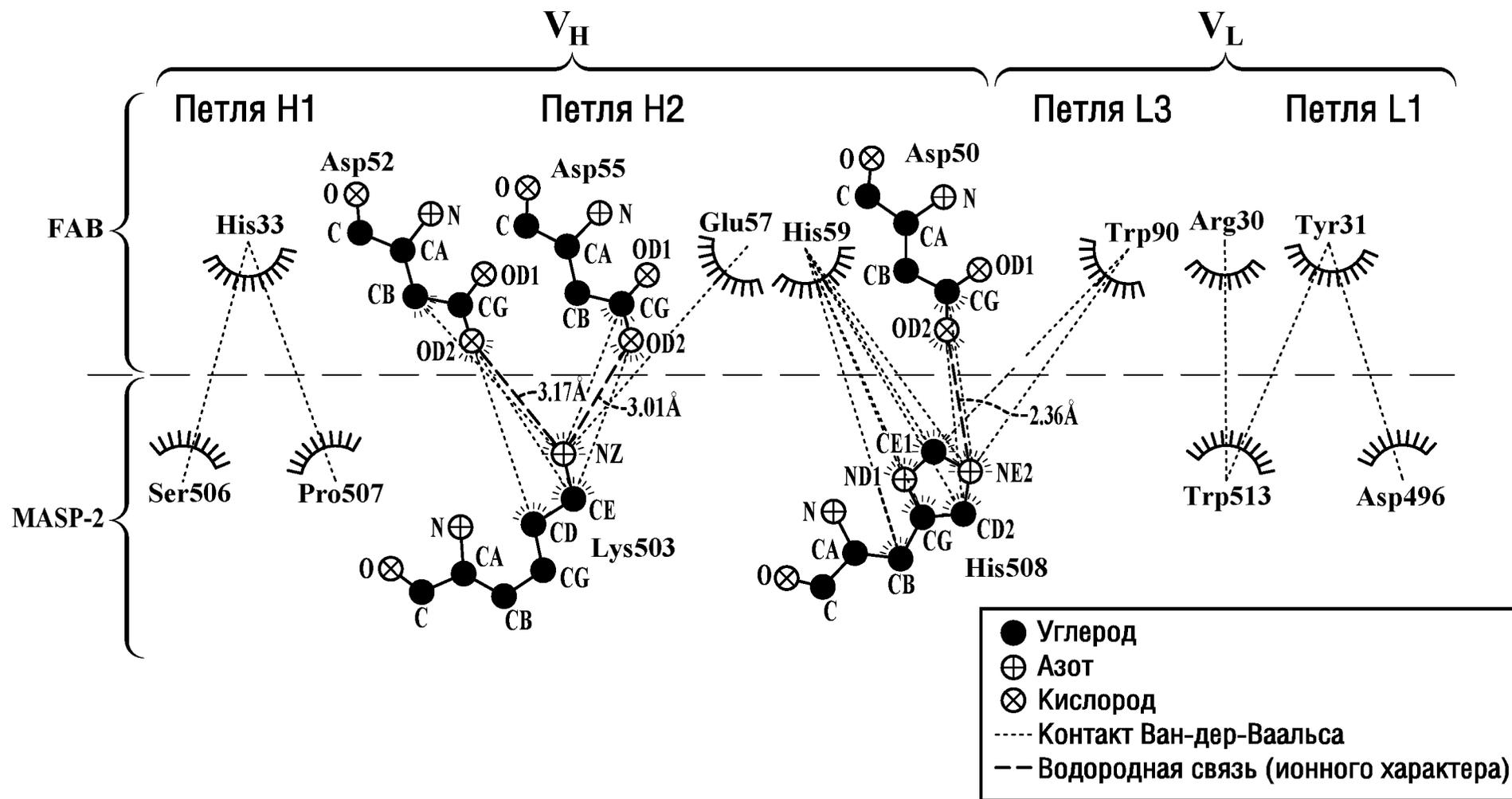
ФИГ.12



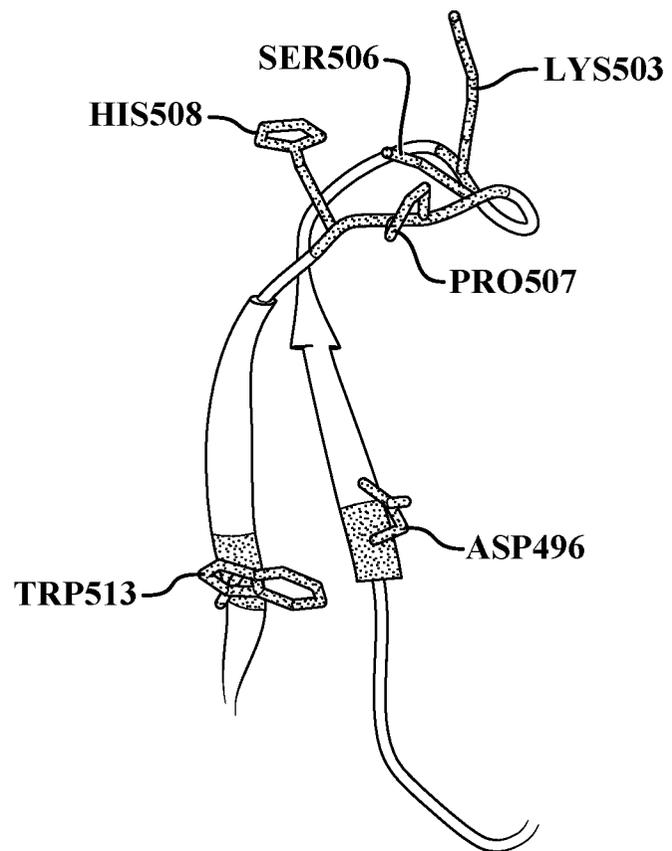
ФИГ.12



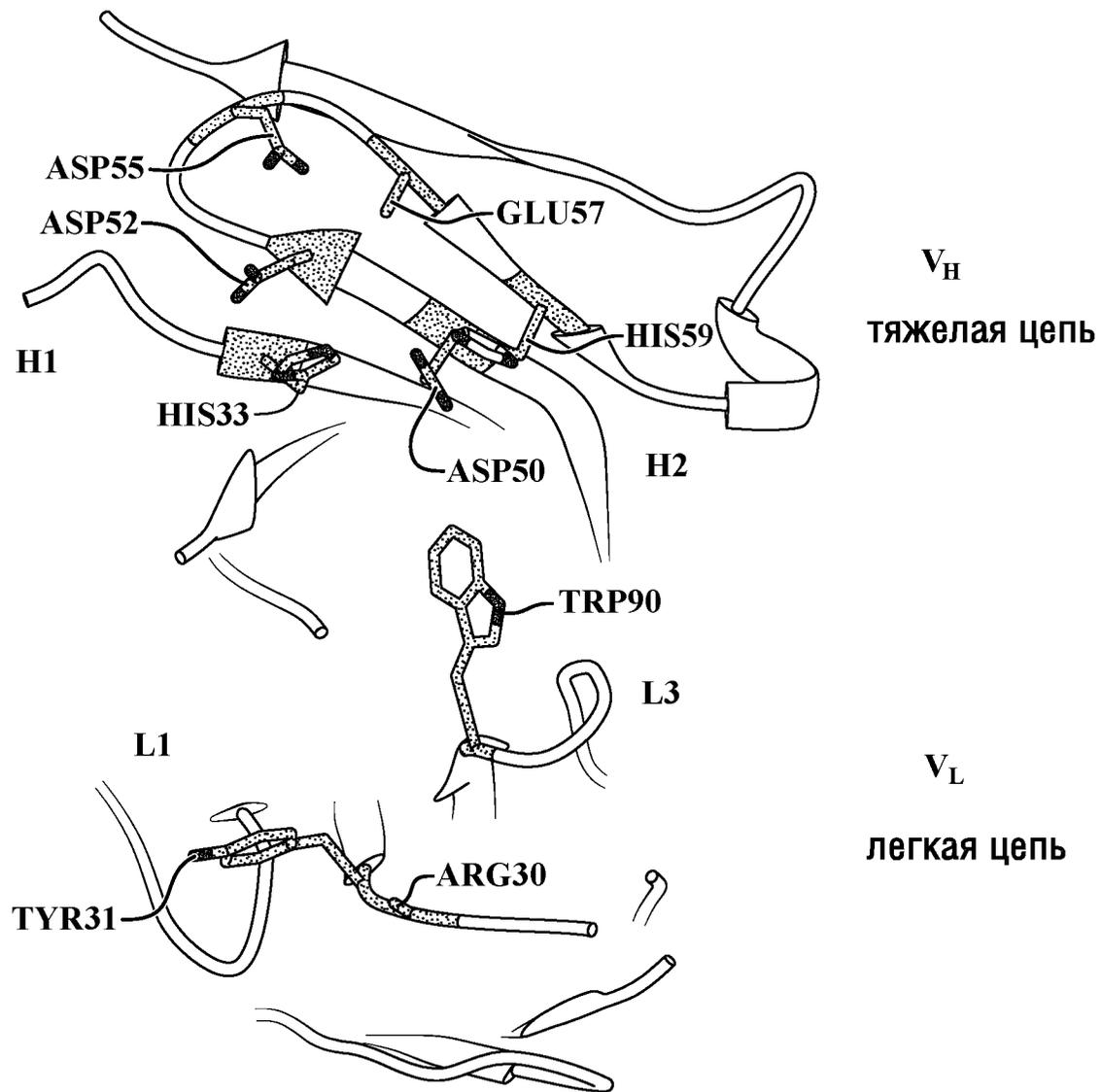
ФИГ.13



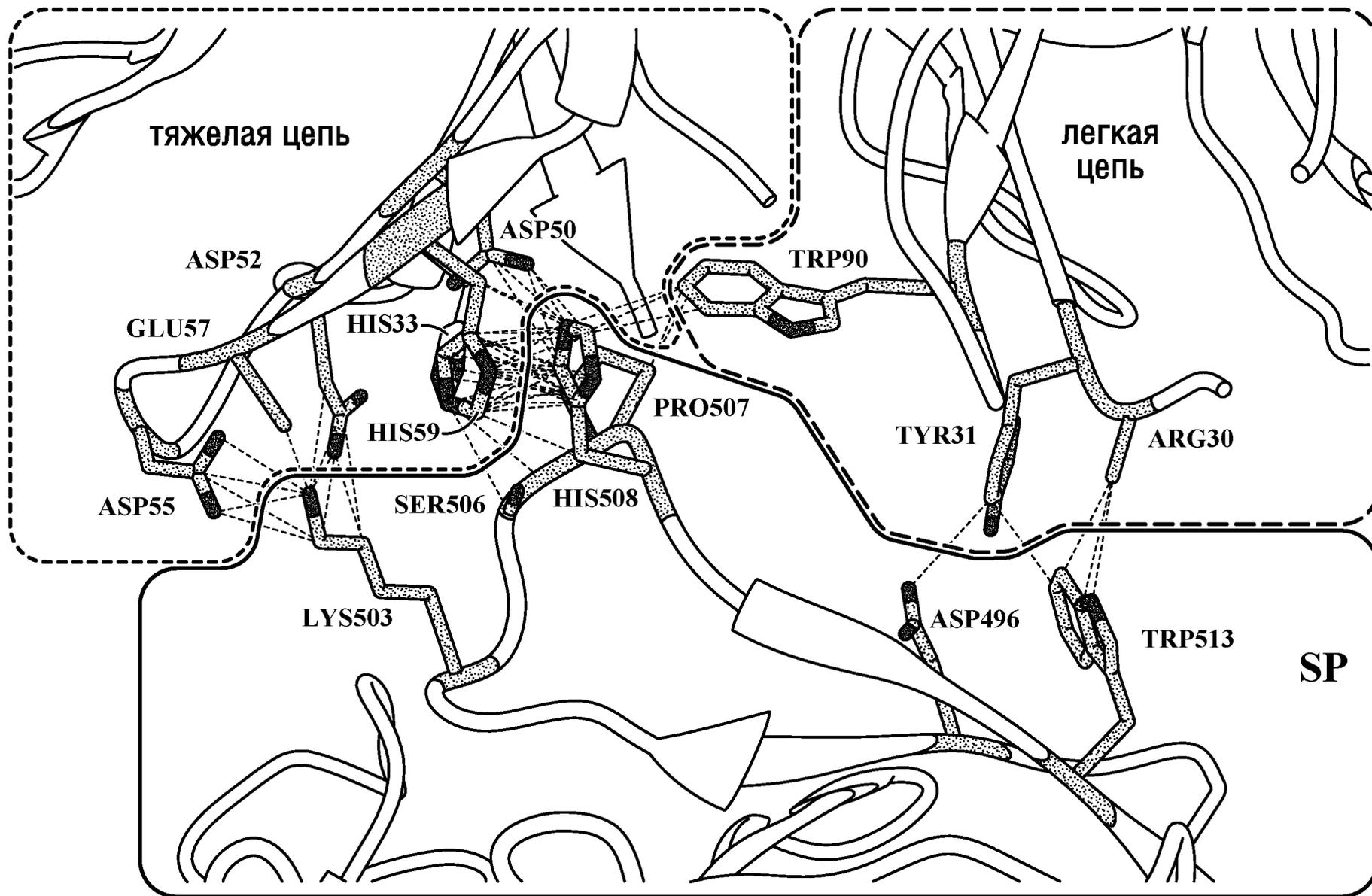
ФИГ.14А



ФИГ.14В

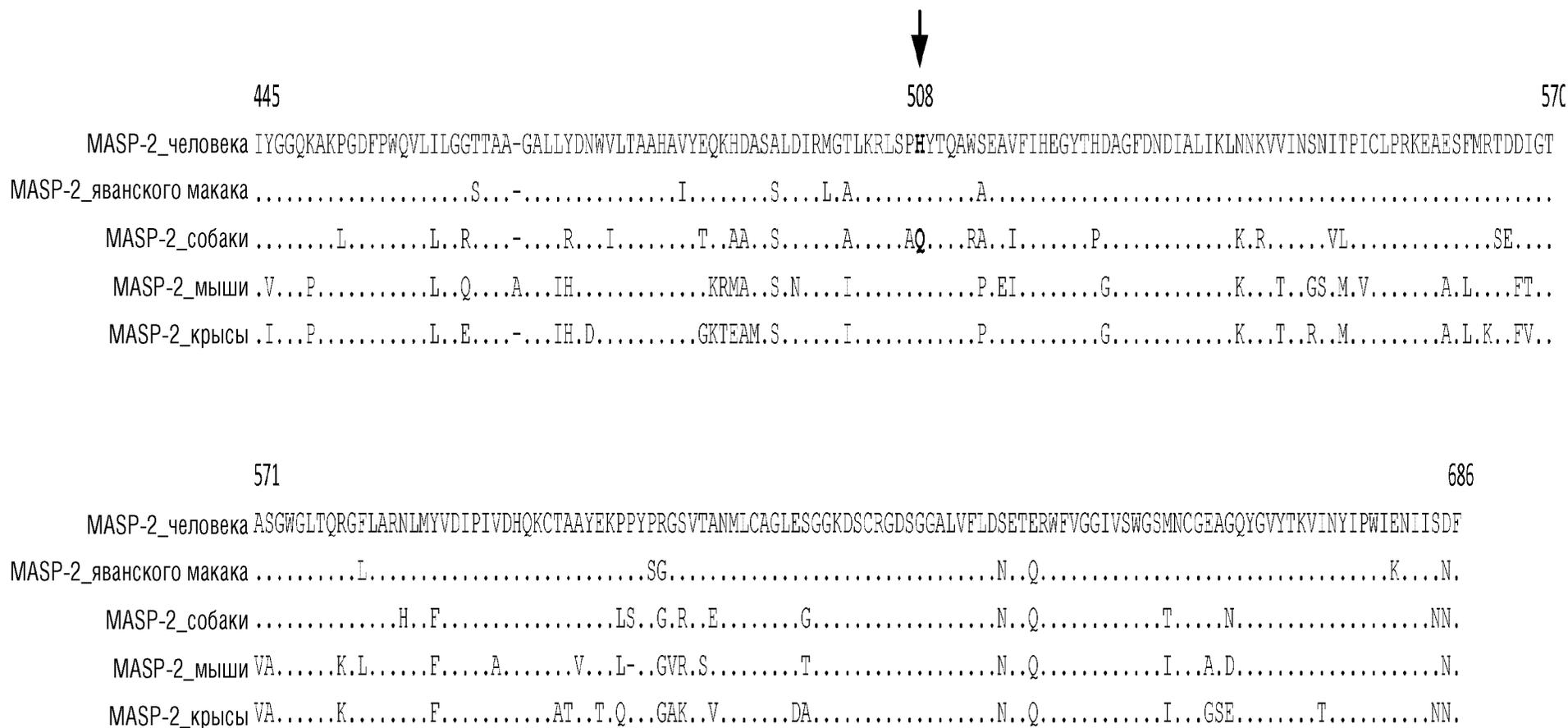


ФИГ.15

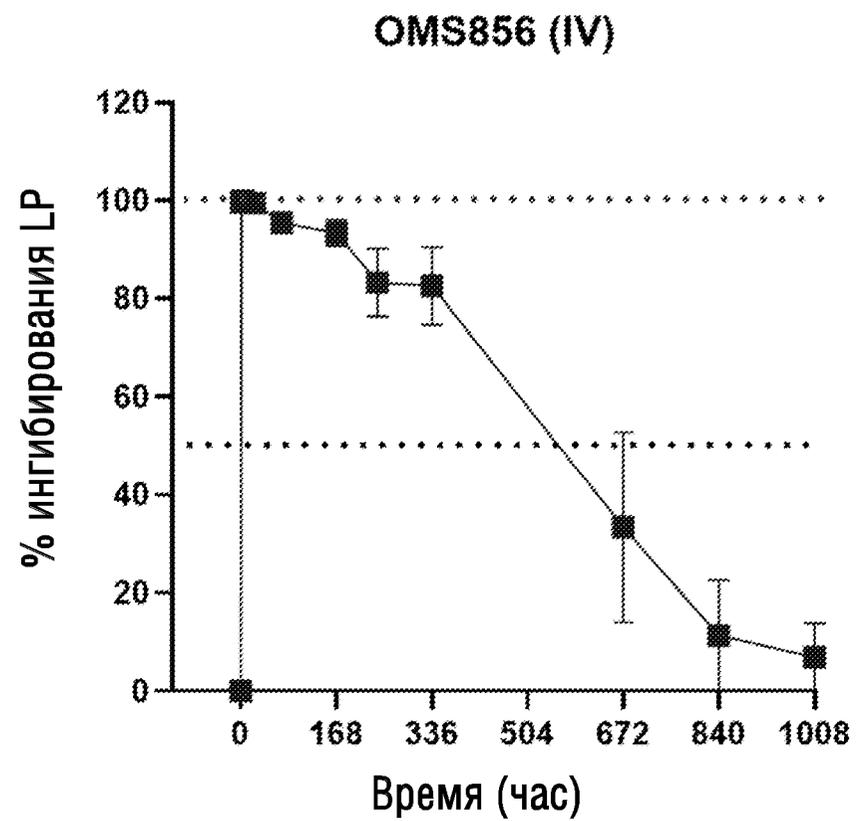


ФИГ.16

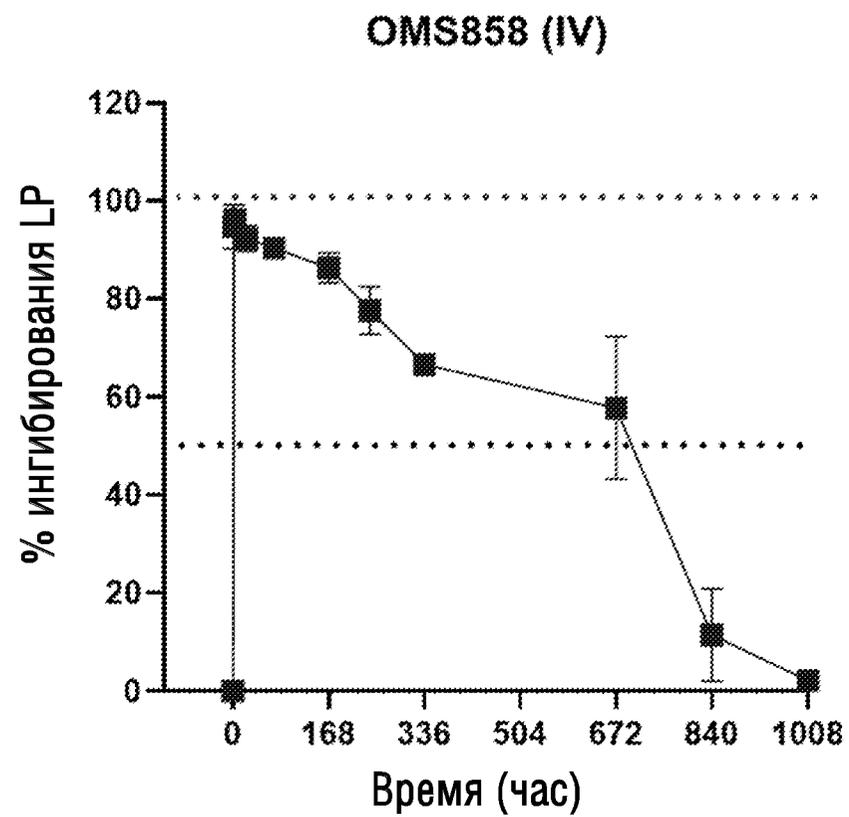
Выравнивание последовательности домена SP MASP-2



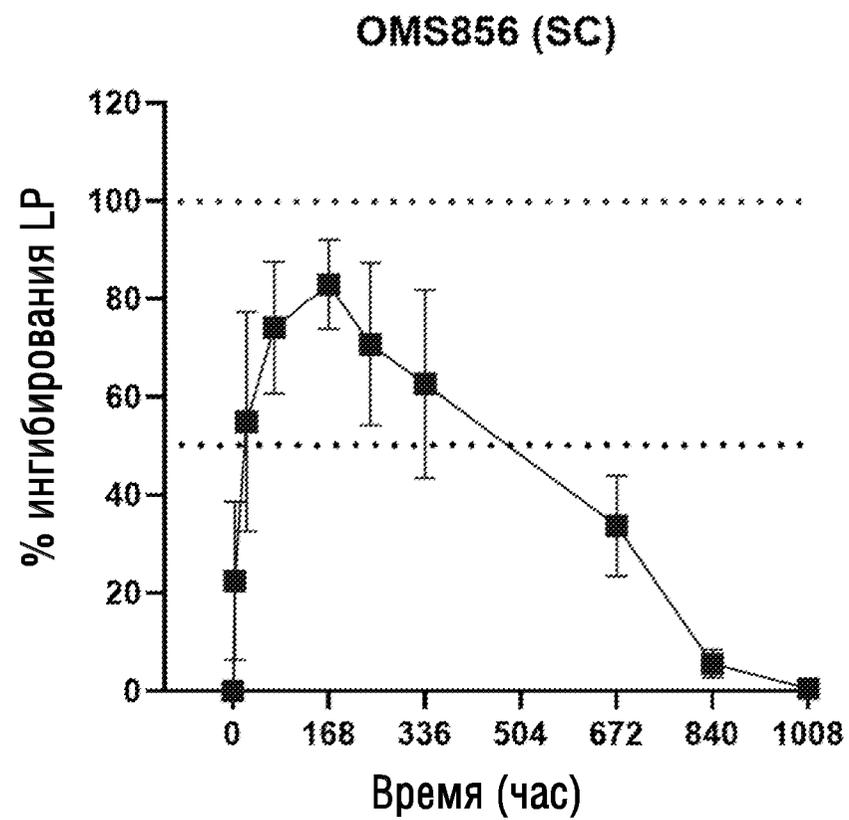
ФИГ.17А



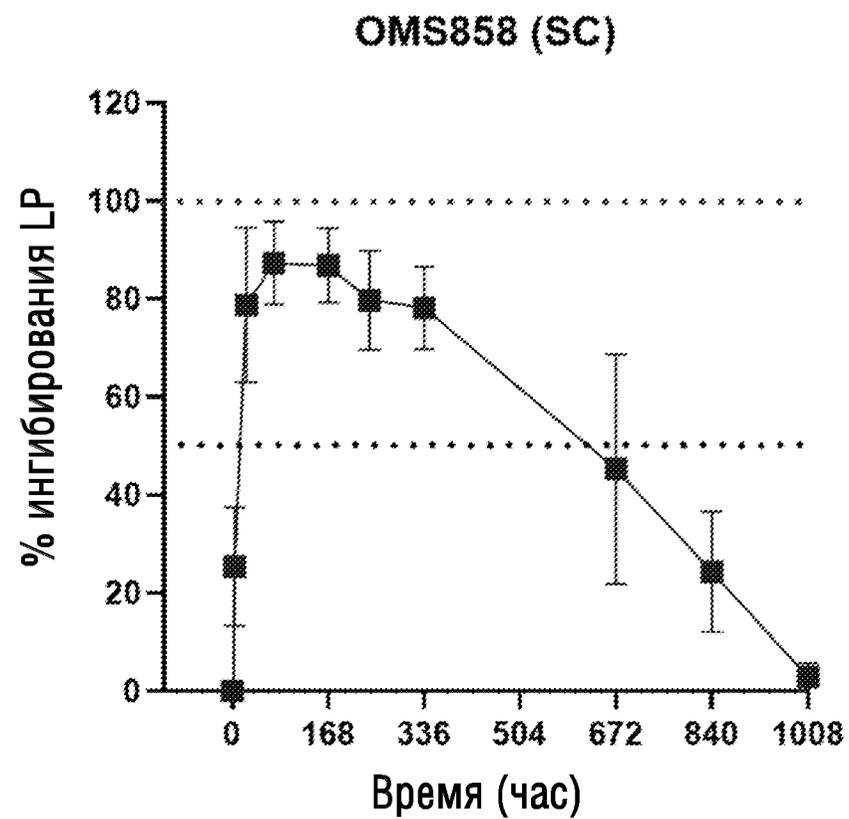
ФИГ.17В



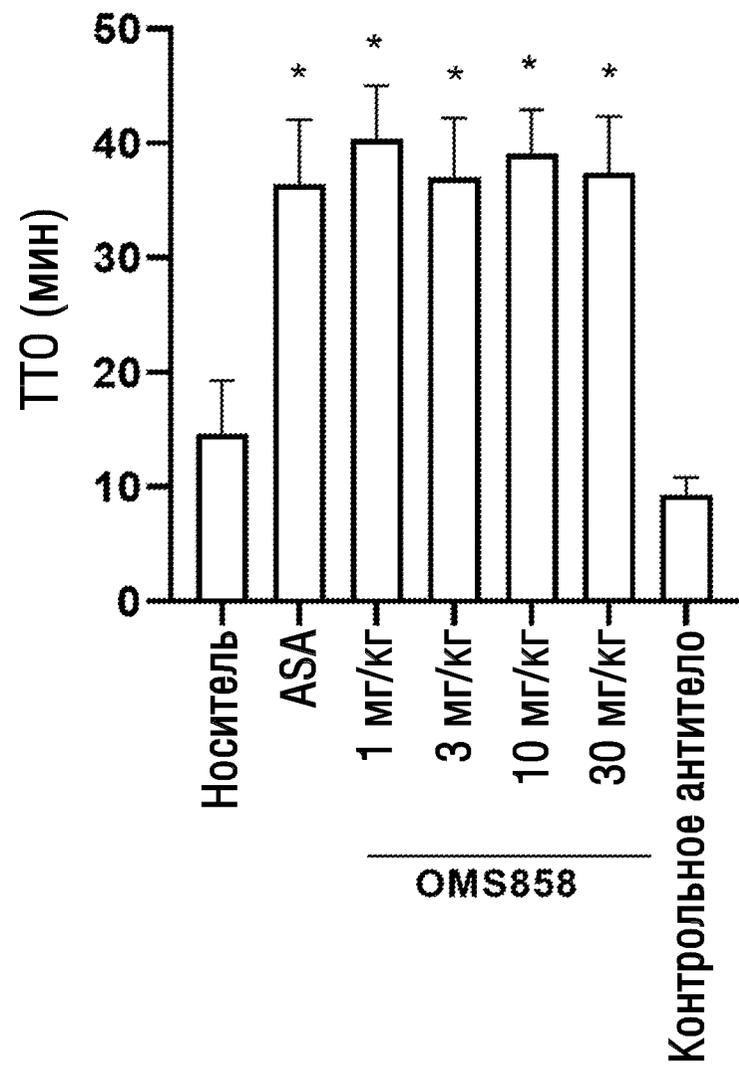
ФИГ.18А



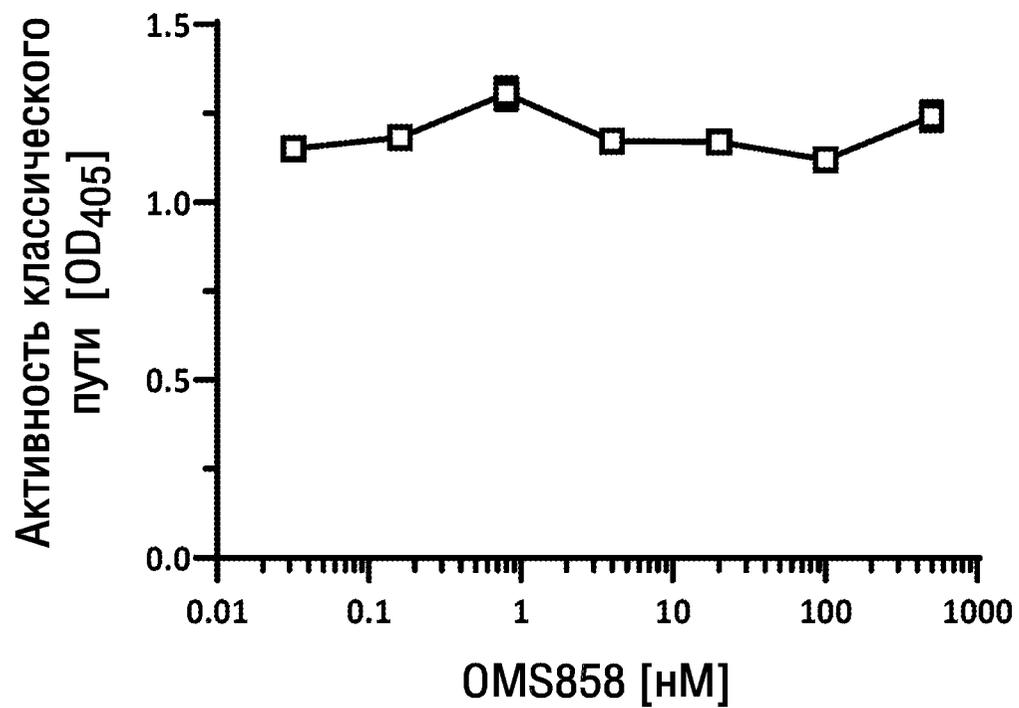
ФИГ.18В



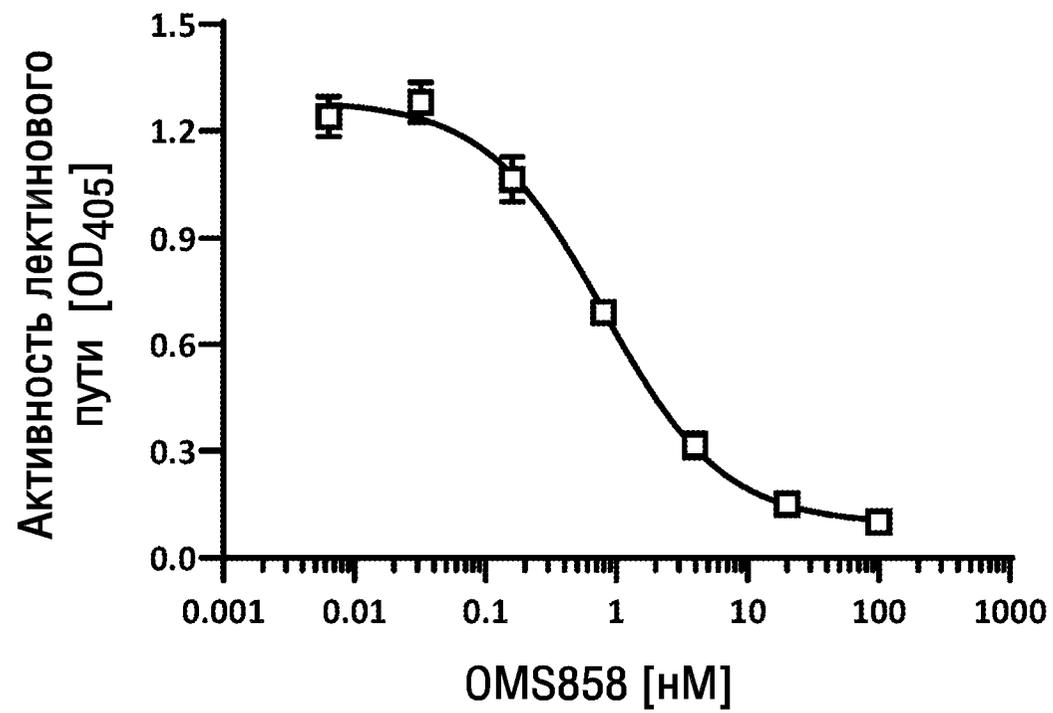
ФИГ.19



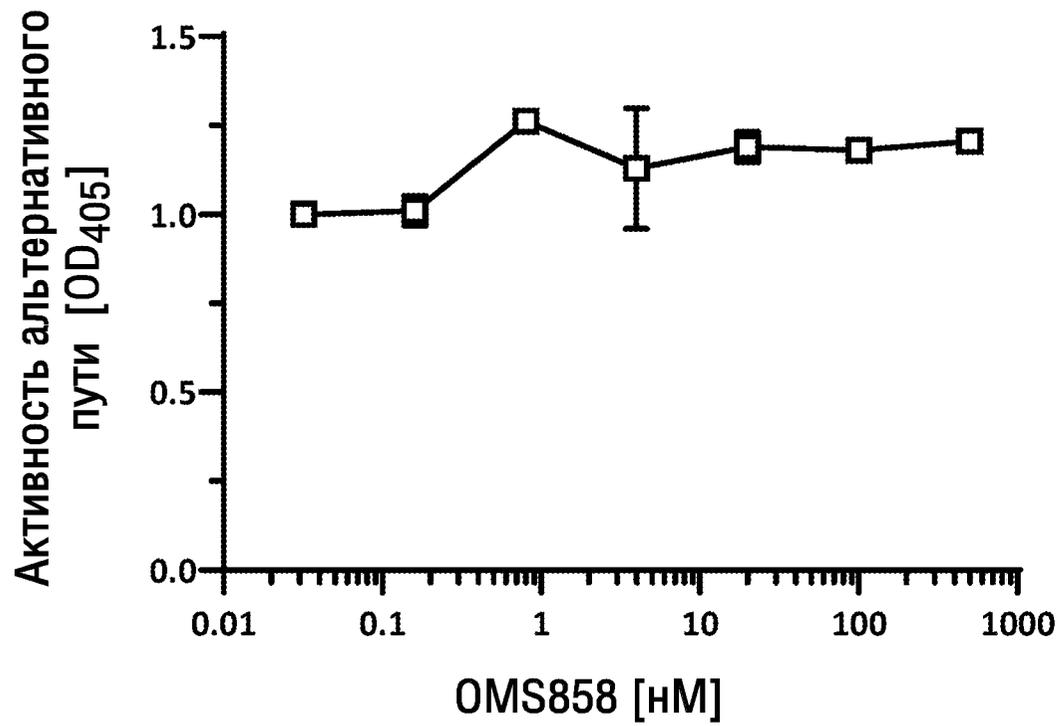
ФИГ.20А



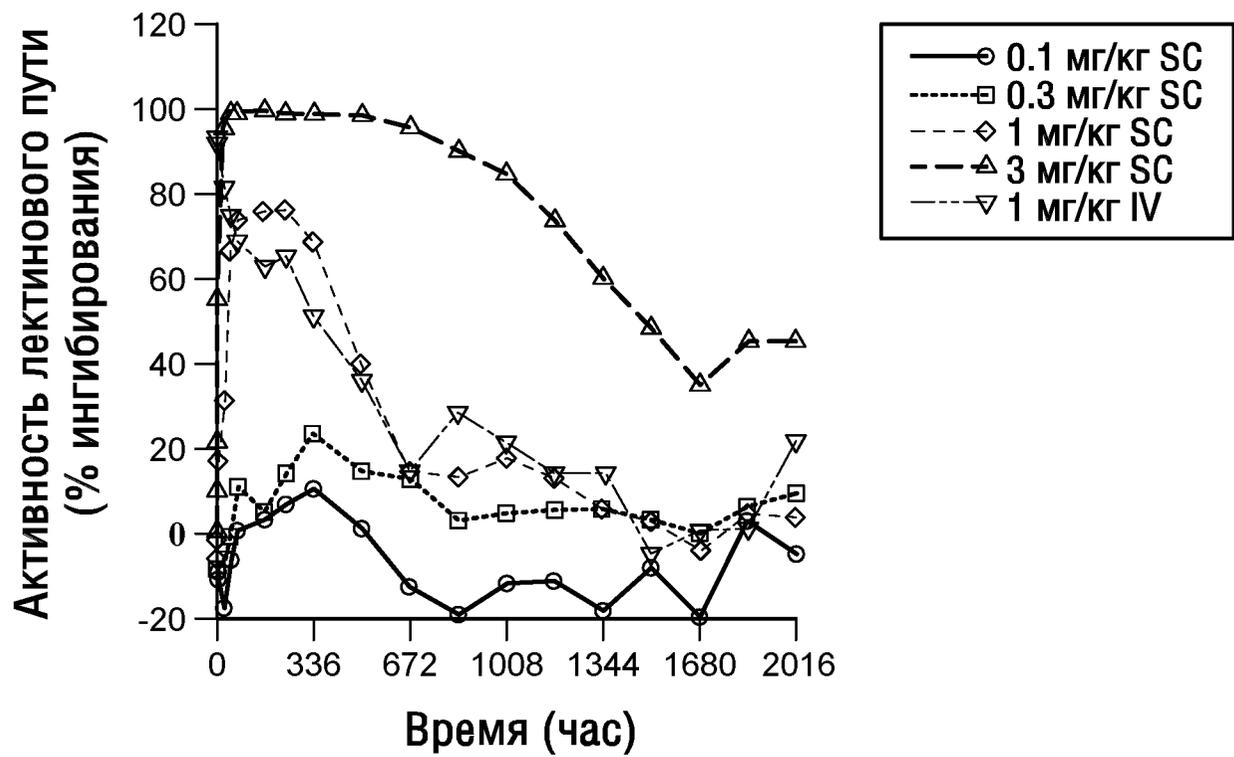
ФИГ.20В



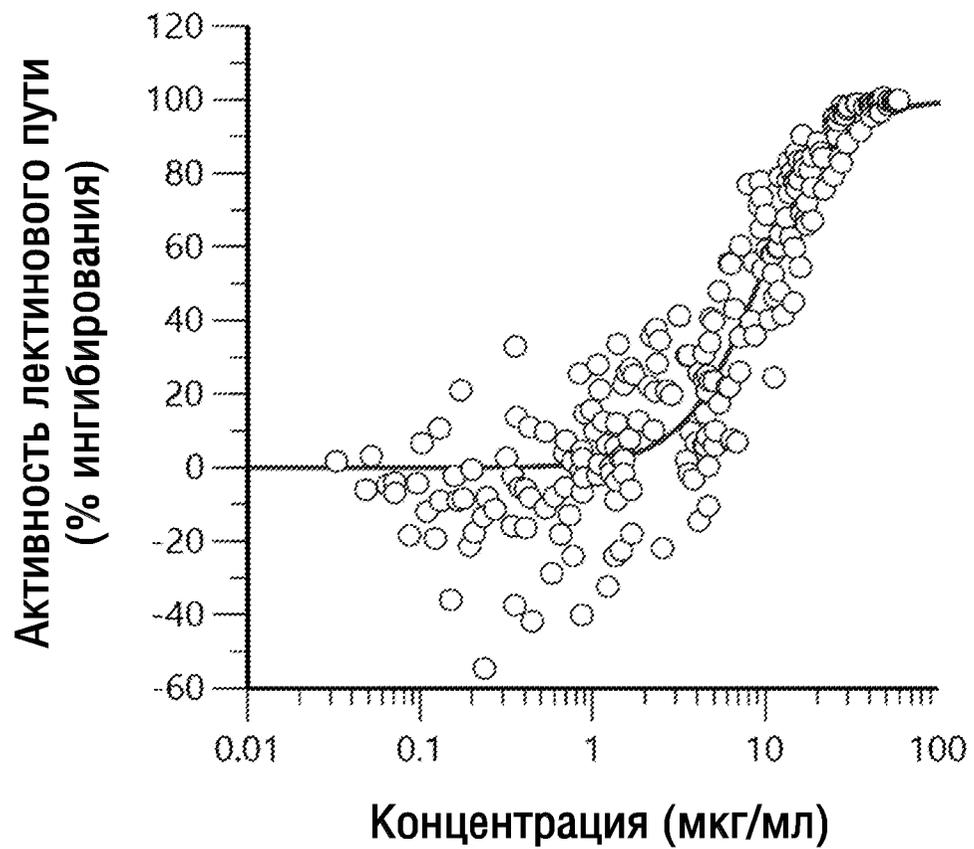
ФИГ.20С



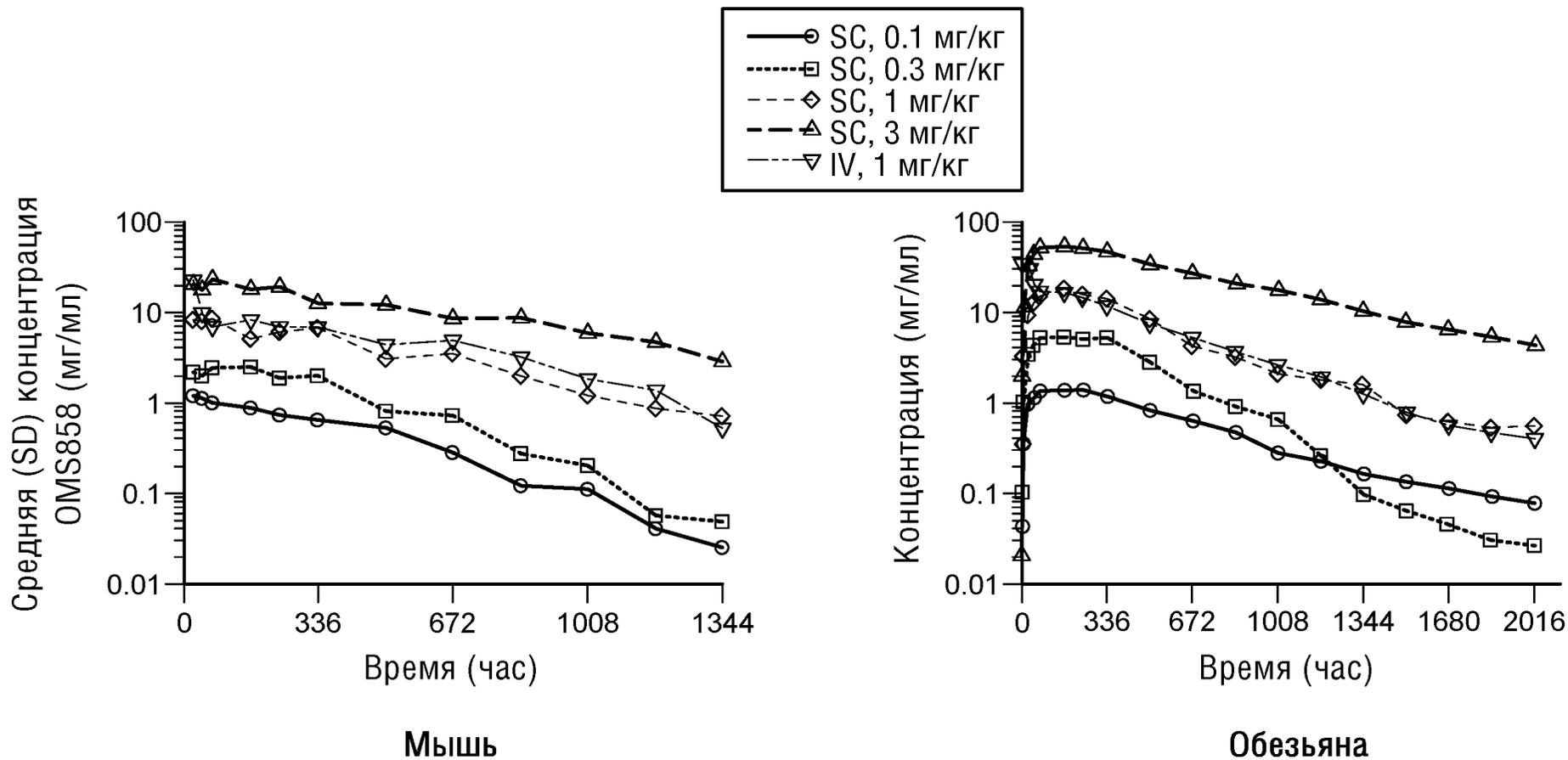
ФИГ.21



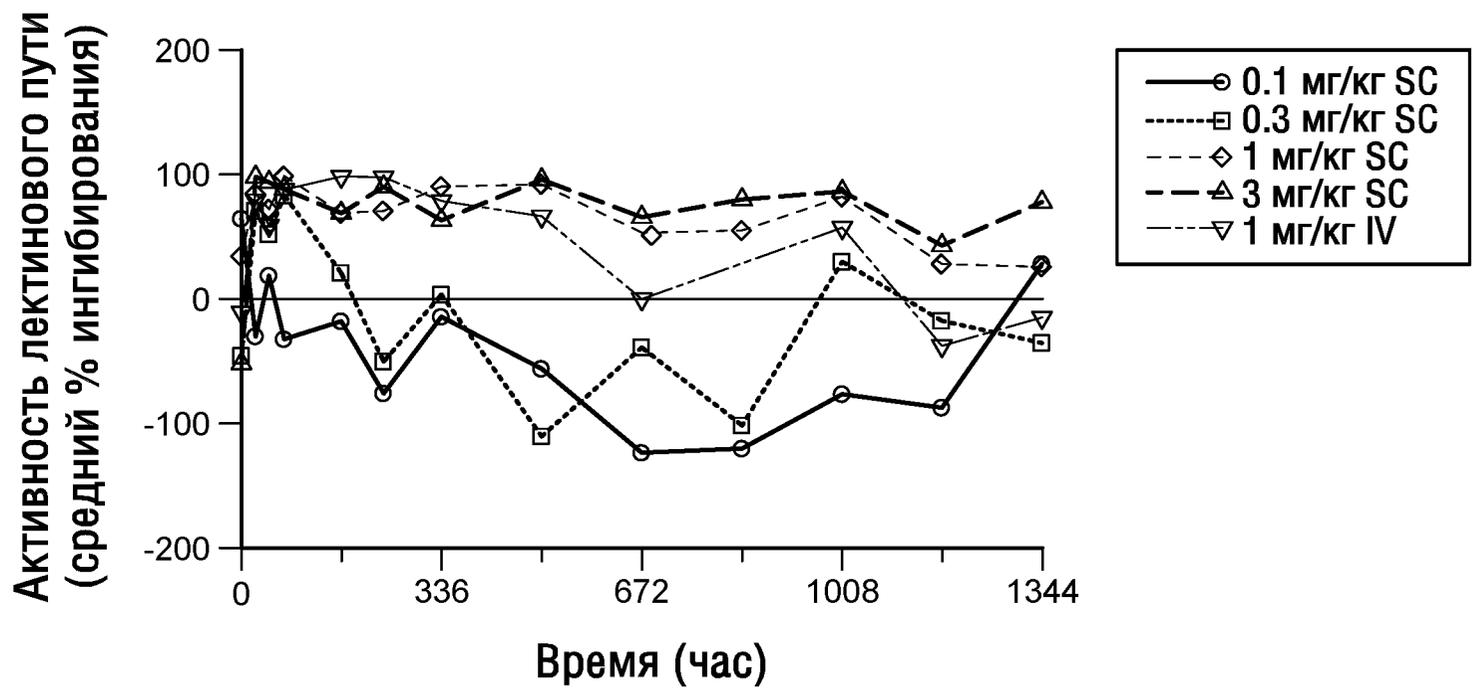
ФИГ.22



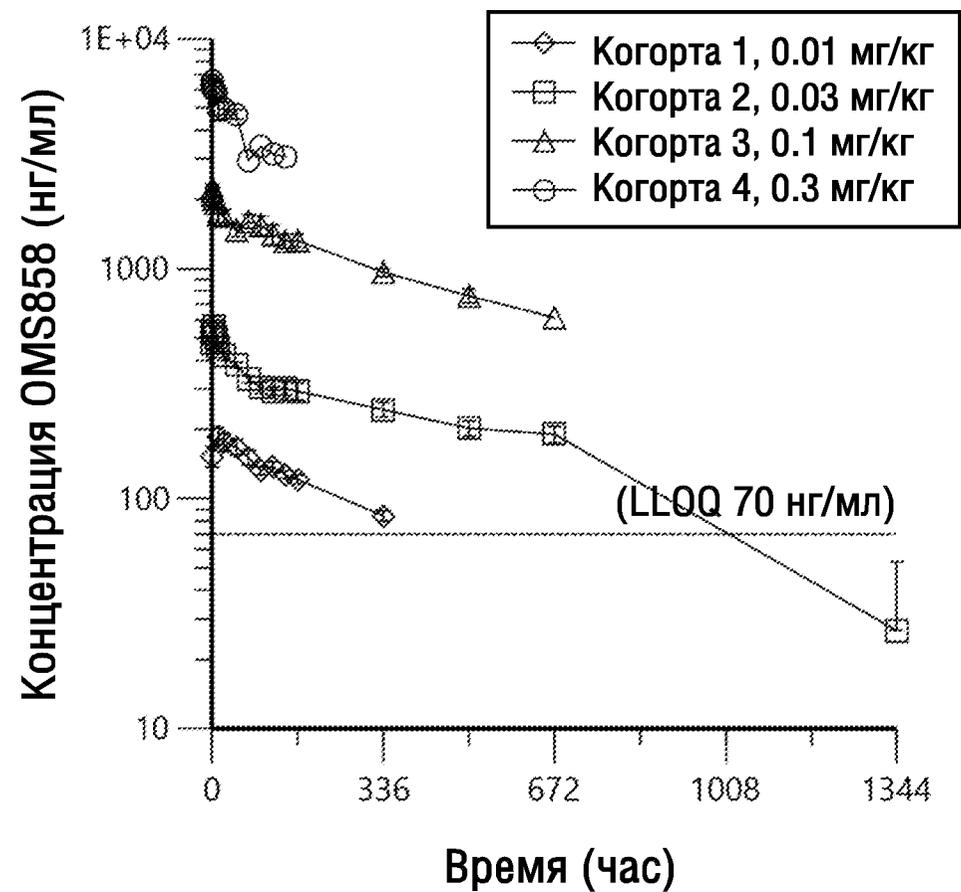
ФИГ.23



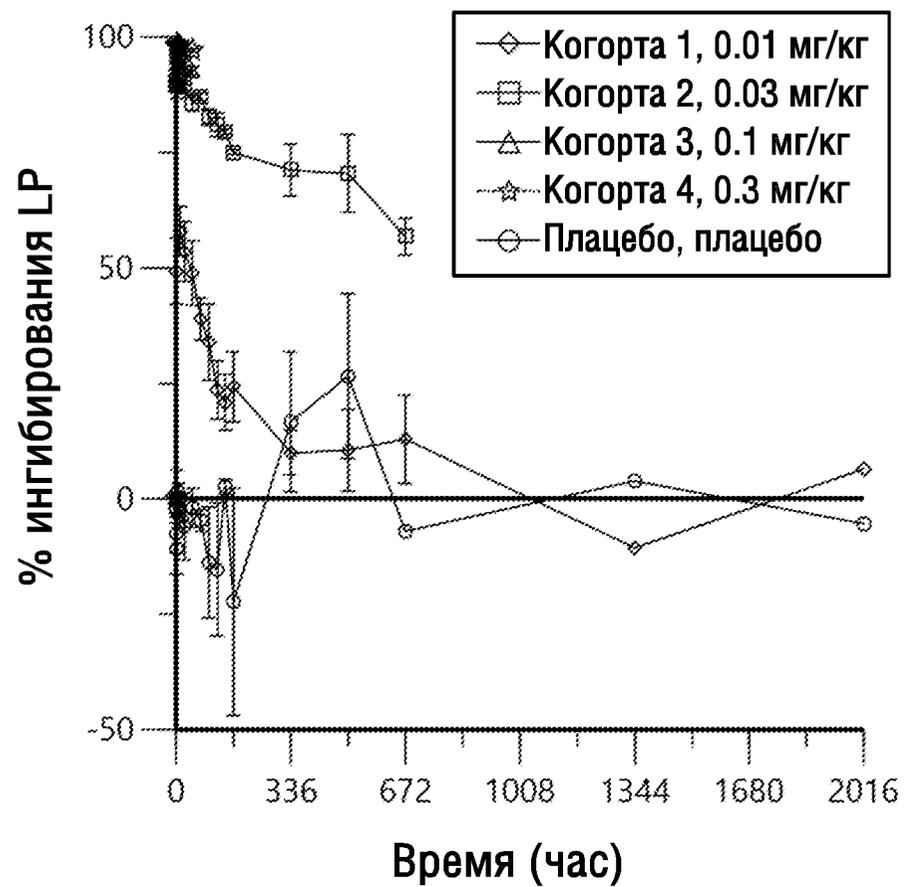
ФИГ.24



ФИГ.25



ФИГ.26



ФИГ.27

